

Analyse der Funktion von Dynamin2 in der Integrin-vermittelten Adhäsion humaner T-Lymphozyten

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Felix Julian Eppler
aus Tübingen

Bonn, 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1.Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus
2.Gutachter: PD Dr. Heike Weighardt

Tag der Promotion: 24. Oktober 2017
Erscheinungsjahr: 2017

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Felix J. Eppler, Thomas Quast, and Waldemar Kolanus. **Dynamin2 controls Rap1 activation and integrin clustering in human T lymphocyte adhesion.** *PloS One*, 12(3):e0172443, 2017.

Weitere Publikationen:

Anna Ulbricht, Felix J. Eppler*, Victor E. Tapia*, Peter F. M. van der Ven*, Nico Hampe, Nils Hersch, Padmanabhan Vakeel, Daniela Stadel, Albert Haas, Paul Saftig, Christian Behrends, Dieter O. Fürst, Rudolf Volkmer, Bernd Hoffmann, Waldemar Kolanus, and Jörg Höhfeld. **Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy.** *Current Biology*, 23(5):430-435, 2013.

*Diese Autoren haben gleichermaßen zur Veröffentlichung beigetragen.

Thomas Quast, Felix Eppler, Verena Semmling, Cora Schild, Yahya Homsy, Shoshana Levy, Thorsten Lang, Christian Kurts, and Waldemar Kolanus. **CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration.** *Blood*, 118(7):1818-1827, 2011.

Konferenzbeiträge:

- Felix Eppler and Waldemar Kolanus. Dynamin2 regulates Rap1-dependent lymphocyte adhesion.

Vortrag und Posterbeitrag zum 3D Lab Exchange Symposium 2016 in Pisa.

- Felix Eppler and Waldemar Kolanus. Dynamin2 is essential for integrin-clustering and regulates Rap1-activation in lymphocyte adhesion.

Posterbeitrag zum 2. Immunosensation Science Day 2014 in Bonn.

Ausgezeichnet mit dem Preis für ein hervorragendes Poster.

- Felix Eppler and Waldemar Kolanus. Dynamin2 regulates Rap1-dependent lymphocyte adhesion.

Posterbeitrag zur 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie 2014 in Bonn.

- Felix Eppler and Waldemar Kolanus. Dynamin2 regulates Rap1 activation and lymphocyte adhesion.

Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin 2014 in Bonn.

- Felix Eppler. Role of Dynamin2 in Rap1-dependent lymphocyte adhesion.

Vortrag zum 1. Immunosensation Science Day 2013 in Bonn.

Ausgezeichnet mit dem Preis für eine hervorragende Präsentation.

- Felix Eppler, Thomas Quast, Yahya Homsy, Shoshana Levy, Thorsten Lang, and Waldemar Kolanus. Different actors, different acts, same play - plasticity of dendritic cell migration.

Posterbeitrag zum 3. European Congress of Immunology 2012 in Glasgow.

- Thomas Quast, Felix Eppler, Yahya Homsy, Shoshana Levy, Thorsten Lang, and Waldemar Kolanus. Role of CD81 asymmetry in the mobilization of integrin clusters into the leading edge of polarized immune cells during migration.

Posterbeitrag zur 5. European Conference on Tetraspanins 2012 in Nijmegen.

-
- Felix Eppler. The role of the tetraspanin CD81 in the mobilization of integrin clusters during immune cell migration.

Vortrag zum German-Japanese Joint Symposium for Diamond Researchers 2011 in Bonn.

- Felix Eppler. The role of the tetraspanin CD81 in dendritic cell migration.

Vortrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin 2011 in Bonn.

Ausgezeichnet mit dem BFB-Diplompreis 2010.

- Thomas Quast, Felix Eppler, Verena Semmling, Cora Schild, Shoshana Levy, Christian Kurts, and Waldemar Kolanus. Critical role for the tetraspanin CD81 in Rac1-activation and adhesion-dependent dendritic cell migration.

Posterbeitrag zur 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie 2011 in Bonn.

- Thomas Quast, Felix Eppler, Cora Schild, and Waldemar Kolanus. CD81 is essential for Rac1-dependent membrane protrusion activity in integrin-dependent dendritic cell migration.

Posterbeitrag zur 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie 2010 in Leipzig.

- Thomas Quast, Verena Semmling, Felix Eppler, Cora Schild, Christian Kurts, and Waldemar Kolanus. Function of CD81 in dendritic cell migration: tissue-specific role in lymphoid homing.

Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin 2010 in Bonn.

Zusammenfassung

Das Immunsystem ist ein dezentralisiertes Organ, dessen zelluläre Bestandteile dazu in der Lage sein müssen, ihre Aufenthaltsorte innerhalb des Körpers rasch zu verändern, um effektive Immunantworten zu gewährleisten. So sind Immunzellen auf die Durchschreitung verschiedenster Gewebetypen spezialisiert, welche sich nicht nur in ihrer Komposition und Architektur deutlich voneinander unterscheiden, sondern auch gänzlich unterschiedliche physikalische Eigenschaften mit sich bringen können. Beispielsweise müssen Leukozyten zum einen unter dem Einfluss starker Scherkräfte an einer 2-dimensionalen endothelialen Oberfläche aus Blutgefäßen austreten, bewegen sich zum anderen aber auch durch das Interstitium, komplett eingebettet in Bestandteile der extrazellulären Matrix. Während manche Situationen wie die Extravasation aus Blutgefäßen eine starke Adhäsion der Leukozyten erfordern, können andere Prozesse, wie die Bewegung durch räumlich beengende 3-dimensionale Umgebungen, auch ohne eine Adhäsion der Zellen stattfinden. Dementsprechend sind die meisten Immunzellen dazu in der Lage, ihre Adhäsionsfähigkeit schnell und präzise zu modulieren, was durch die Regulation der Aktivität ihrer wichtigsten Adhäsionsmoleküle gewährleistet wird, der Integrine.

Durch die Anwendung einer ganzen Reihe unterschiedlicher molekularbiologischer, zellbiologischer, biochemischer und funktionaler Methoden konnte in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die große GTPase Dynamin2, welche bisher primär im Kontext der Endozytose und anderen Prozessen der Membrandynamik untersucht wurde, ein essentieller Regulator der Integrin-vermittelten Adhäsion und Migration humaner Lymphozyten ist. Als Modellsystem wurden vorzugsweise humane primäre CD4⁺ T-Zellen, teilweise aber auch Jurkat E6.1 T-Lymphozyten verwendet. Die Funktion von Dynamin2 wurde gestört, indem entweder die GTPase-Aktivität des Enzyms durch die Zugabe unterschiedlicher chemischer Inhibitoren blockiert oder die Expression der großen GTPase mit Hilfe siRNA-vermittelter RNA-Interferenz herunterreguliert wurde. Dies führte jeweils zu einer starken Reduzierung der Integrin-vermittelten Adhäsion und Migration der T-Lymphozyten *in vitro*. Interessanterweise konnte dieser Phänotyp jedoch nicht beobachtet werden, wenn mit Dynamin2-unabhängigen Inhibitoren der Endozytose, des vesikulären Transports oder der F-Aktin-Polymerisierung gearbeitet wurde, was den Einfluss der großen GTPase auf die Integrin-vermittelte Adhäsion von Lymphozyten von diesen Prozessen abgrenzt.

Während grundlegende Signaltransduktionsprozesse in Lymphozyten ohne funktionellem Dynamin2 weiterhin ungestört ablaufen konnten, wurde in diesen Zellen jedoch ein spezifischer Effekt auf die kleine GTPase Rap1 beobachtet, einem bekannten Regulator von Integrinen, welcher nicht mehr effektiv aktiviert werden konnte. Zudem stellte die Überexpression aktivierter Rap1a-eGFP-Fusionsproteine die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner CD4⁺ T-Zellen, welche mit einem Dynamin2-Inhibitor versetzt worden waren, wieder her, was eindeutig zeigt, dass Dynamin2 die Adhäsion dieser Zellen durch die Aktivierung von Rap1 reguliert. Dynamin2 konnte außerdem in Signaltransduktionskomplexen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen beobachtet werden, in denen ebenfalls die aktivierten Tyrosinkinasen FAK, Pyk2, Kinasen der Src-Familie sowie RapGEF1 zu finden waren. Die Aktivierung von FAK und Pyk2, welche eine Grundvoraussetzung für die Bildung dieser Signalkomplexe darstellt, war abhängig von funktionellem Dynamin2, ebenso wie die Aktivierung von RapGEF1, einem wichtigen Guaninnukleotid-Austauschfaktor von Rap1, welcher durch Kinasen der Src-Familie aktiviert wird. Dies lässt die Vermutung zu, dass Dynamin2 durch die Organisation von Signalkomplexen die Aktivierung von Rap1 in einer FAK/Pyk2- und RapGEF1-abhängigen Weise reguliert und somit die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Lymphozyten stark beeinflusst.

Integrine können auf unterschiedliche Weise in ihrer Aktivität moduliert werden. Zum einen durch die Regulation der Affinität für ihre Liganden, was durch Konformationsänderungen der einzelnen Integrin-Moleküle erreicht wird, zum anderen aber auch durch die Valenz der Integrine, also ihrem *Clustering*. Die kleine GTPase Rap1 wurde bereits in beiden Mechanismen der Integrin-Aktivierung impliziert. Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Einfluss von Dynamin2 auf die Ausbildung von Integrin-Epitopen mit hoher Affinität für ihre Liganden beobachtet werden, während die Inhibition der GTPase-Aktivität von Dynamin2 zu einem massiven Verlust von Integrin-*Clustern* vor und nach der Aktivierung von T-Zellen führte. Dies spricht für eine spezifische Rolle von Dynamin2 in der Valenzregulation von Integrinen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte Dynamin2 somit als neuer Regulator der Integrin-vermittelten Adhäsion und Migration humaner T-Lymphozyten beschrieben werden, wobei sich die große GTPase auf diesen Prozess über die Organisation der RapGEF1-abhängigen Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 auswirkt. Interessanterweise nimmt Dynamin2 dabei spezifischen Einfluss auf die Integrin-Valenz, wirkt sich jedoch nicht auf die Affinität von Integrinen für ihre Liganden aus. Dies lässt Dynamin2 eine Schlüsselposition bei der Differenzierung von Regulationsmechanismen der Integrin-Affinität und -Valenz zukommen, welche meist schwer voneinander zu trennen sind.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die T-Zelle und ihre Rolle im Immunsystem	1
1.1.1	Das Immunsystem der Wirbeltiere	1
1.1.2	Die T-Zelle und ihre Funktionen	2
1.1.3	Eine zielgerichtete Migration sowie die dynamische Rezirkulation von Leukozyten sind essentielle Grundlagen für das Immunsystem .	2
1.2	Zelladhäsion und -migration von Immunzellen	4
1.2.1	Zelladhäsion	4
1.2.2	Zellmigration	5
1.2.3	Zellmigration von Leukozyten	6
1.2.4	Extravasation von Leukozyten	7
1.3	Integrine	8
1.3.1	Funktion und Struktur von Integrinen	8
1.3.2	Mechanismen der Integrin-Aktivierung	10
1.3.3	Integrin-Aktivierung durch die kleine GTPase Rap1	13
1.4	Die große GTPase Dynamin2	16
1.4.1	Die Familie der Dynamin-ähnlichen Proteine	16
1.4.2	Aufbau und Struktur von Dynamin2	16
1.4.3	Wirkmechanismus von Dynamin2 in der Clathrin-vermittelten En- dozytose	19
1.4.4	Einfluss von Dynamin2 auf das F-Aktin-Zytoskelett sowie Zellmi- gration und -adhäsion	19
1.4.5	Bisher beschriebene Funktionen von Dynamin2 in T-Lymphozyten	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien	26
2.1.4	Kommerzielle Reaktionssysteme (Kits)	28

2.1.5	<i>TaqMan</i> -qPCR-Sonden	28
2.1.6	SiRNAs	29
2.1.7	Plasmide	29
2.1.8	Klonierungsprimer	29
2.1.9	Antikörper	30
2.1.10	Zellkulturmedien, -seren, -lösungen und -zusätze	32
2.1.11	Komplexe Zellkulturmedien	32
2.1.12	Organismen	33
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.3	Fällung des PCR-Produktes und DNA-Aufreinigung	34
2.2.4	Restriktionsverdau	35
2.2.5	Ligation	35
2.2.6	Bakterienkultur	35
2.2.7	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	36
2.2.8	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	36
2.2.9	Expressionsanalyse durch quantitative <i>Real-time</i> -PCR	38
2.3	Zellbiologische Methoden	40
2.3.1	Isolation und Kultur von primären humanen Lymphozyten	40
2.3.2	Kultur der T-Zelllinie Jurkat E6.1	41
2.3.3	Zellzahlbestimmung	41
2.3.4	Elektroporation primärer humaner CD4 ⁺ T-Zellen mit siRNA oder Vektor-DNA	42
2.3.5	Elektroporation von Jurkat E6.1 T-Zellen mit Vektor-DNA	43
2.3.6	Chemische Inhibition verschiedener Enzyme oder zellbiologischer Prozesse in Lymphozyten	43
2.3.7	Immunfluoreszenzmarkierung an adhärenenten Jurkat E6.1 T-Zellen	44
2.3.8	Analyse von Proteindynamiken und -lokalisation an lebenden Jur- kat E6.1 T-Zellen	45
2.3.9	Analyse von Proteindynamiken an lebenden Jurkat E6.1 T-Zellen mittels FRAP (<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>)	46
2.3.10	Markierung filamentösen Aktins in fixierten sowie lebenden Zellen	46
2.3.11	Analyse des Integrin- <i>Clusterings</i> auf primären CD4 ⁺ T-Zellen	47
2.3.12	Quantifizierung der Chemokin-induzierten Polarisierung humaner CD4 ⁺ T-Zellen	49
2.3.13	Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie	50
2.3.14	Durchflusszytometrie	50

2.4	Funktionale Analysen	51
2.4.1	Adhäsions-Analyse humaner Lymphozyten unter statischen Bedingungen	51
2.4.2	Adhäsions-Analyse humaner CD4 ⁺ T-Zellen unter unidirektionaler laminarer Strömung	52
2.4.3	Analyse der Migration von CD4 ⁺ T-Zellen mittels einer modifizierten <i>Transwell</i> -Boyden-Kammer	53
2.4.4	Analyse der Migration humaner CD4 ⁺ T-Zellen auf 2-dimensionalen Integrin-Liganden	54
2.4.5	Analyse der Migration humaner CD4 ⁺ T-Zellen in 3-dimensionalen Kollagen-Gelen	54
2.5	Proteinbiochemische Methoden	55
2.5.1	Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration	55
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.5.3	Western-Blot	57
2.5.4	Immunbiochemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen	58
2.5.5	Regeneration von Proteinblots	58
2.5.6	Biochemischer <i>Pulldown</i> aktivierter kleiner GTPasen	59
2.5.7	Co-Immunpräzipitation	60
2.6	Statistische Auswertung	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Humane CD4 ⁺ T-Zellen als Modellsystem zur Analyse der Immunzelladhäsion	62
3.2	Dynamin2-Expression und -Lokalisation in humanen CD4 ⁺ T-Zellen	63
3.3	Dynamin2 reguliert die statische Integrin-vermittelte Adhäsion humaner Lymphozyten	64
3.4	Dynamin2 reguliert die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner CD4 ⁺ T-Zellen unter laminarer Strömung	69
3.5	Die Integrin-abhängige, aber nicht die Integrin-unabhängige Migration humaner CD4 ⁺ T-Zellen wird durch Dynamin2 reguliert	71
3.6	Die chemische Inhibition des zellulären Vesikeltransports hat keinen Einfluss auf die Adhäsion humaner T-Zellen	77
3.7	F-Aktin-Polymerisierung wird partiell durch Dynamin2 reguliert, ist jedoch nicht essentiell für die Adhäsion humaner CD4 ⁺ T-Zellen	78
3.8	Die Aktivierung von Akt und Erk ist nicht abhängig von der GTPase-Aktivität von Dynamin2	82

3.9	Dynamin2 reguliert die Chemokin-induzierte Polarisierung humaner CD4 ⁺ T-Zellen in ERM-unabhängiger Art und Weise	84
3.10	Dynamin2 ist essentiell für die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1	86
3.11	Dynamin2 co-lokalisiert nicht mit Markern für frühe Endosomen und Lysosomen, Tubulin, β_2 -Integrinen oder Talin1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen	92
3.12	Dynamin2 reguliert die Aktivierung von FAK und Pyk2 und co-lokalisiert mit ihnen sowie mit Kinasen der Src-Familie an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen	95
3.13	Dynamin2 co-lokalisiert mit RapGEF1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen und reguliert dessen Phosphorylierung	97
3.14	Dynamin2 durchläuft eine dynamische Umverteilung an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen	100
3.15	Dynamin2 hat keinen Einfluss auf die Integrin-Oberflächenexpression sowie die Regulation der Integrin-Affinität	107
3.16	Dynamin2 spielt eine wichtige Rolle bei der Valenzregulation von Integrinen	111
4	Diskussion	116
4.1	Dynamin2 reguliert die Integrin-vermittelte Adhäsion und Migration humaner Lymphozyten	117
4.2	Weder Endozytose noch F-Aktin-Polymerisierung sind essentiell für die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Zellen	120
4.3	Die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 ist abhängig von funktionellem Dynamin2	122
4.4	Dynamin2 kontrolliert die Aktivität von Rap1 über FAK/Pyk2 und RapGEF1	124
4.5	Dynamin2 hat eine duale Funktion im Rahmen der T-Zelladhäsion und -aktivierung	128
4.6	Die Valenz, jedoch nicht die Affinität von Integrinen, wird durch Dynamin2 reguliert	129
4.7	Fazit / Ausblick	133
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Literaturverzeichnis	140
	Danksagung	166

1 Einleitung

1.1 Die T-Zelle und ihre Rolle im Immunsystem

1.1.1 Das Immunsystem der Wirbeltiere

Das Immunsystem von Vertebraten, dessen wichtigste Funktion es ist, den Körper vor infektiösen Pathogenen zu beschützen, kann als dezentralisiertes Organ beschrieben werden, welches vorwiegend aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen besteht. Diese sogenannten Leukozyten tragen durch ihre individuellen Fähigkeiten auf sehr unterschiedliche Art und Weise zu den entsprechenden Immunantworten bei, wobei zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort unterschieden wird [1]. Das phylogenetisch wesentlich ältere angeborene Immunsystem basiert primär auf sogenannten Mustererkennungsrezeptoren, die vor allem auf der Zelloberfläche exprimiert oder intrazellulär, aber auch löslich im Extrazellularraum zum Einsatz kommen. Diese Rezeptoren können Pathogene anhand weit verbreiteter und evolutiv konservierter Bestandteile, wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS), erkennen. Die Folge ist eine sehr schnelle, aber relativ unspezifische Immunantwort [2]. Sehr spezifisch agiert hingegen das adaptive Immunsystem, welches primär aus B- und T-Lymphozyten besteht. Auf Grund der somatischen Mutation, einem genetischen Umlagerungsprozess während der Lymphozytenentwicklung, haben die entsprechenden Antigenrezeptoren, also B- und T-Zell-Rezeptoren, eine sehr hohe genetische Variabilität [3]. Dies führt zu der Entstehung eines beträchtlichen Repertoires an Lymphozyten unterschiedlicher und einzigartiger Antigenspezifität, welche sich nach ihrer erfolgreichen Antigen-vermittelten Aktivierung durch klonale Expansion massiv vermehren und in Effektorzellen differenzieren können. Eine sehr spezifische adaptive Immunantwort ist die Folge, welche jedoch erst 5-7 Tage nach der angeborenen Immunantwort eintritt. Bei einer Sekundärinfektion mit einem identischen Erreger wird diese Verzögerung jedoch durch den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses in Form von Gedächtniszellen stark verkürzt und optimiert [1]. Die adaptive Immunantwort beinhaltet zum einen eine humorale, zum anderen eine zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird durch Effektor-B-Zellen (Plasmazellen) vermittelt, die große Mengen an löslichen Antikörpern sezernieren, welche die gleiche Antigenspezifität haben wie der B-Zell-Rezeptor, mit dem die entsprechende Plasmazelle ursprünglich aktiviert wurde.

Die sezernierten Antikörper binden und vernetzen ihre spezifischen Antigene, was beispielsweise zu einer Präzipitation löslicher Toxine oder einer Agglutination pathogener Organismen führt und diese für die Phagozytose durch Makrophagen targetiert [4].

1.1.2 Die T-Zelle und ihre Funktionen

Ebenfalls involviert in das Einleiten der humoralen, jedoch auch Hauptbestandteil der zellulären Immunantwort, sind die T-Zellen, welche ihren Namen auf Grund ihrer Reifung und Selektion innerhalb des Thymus tragen. T-Zellen werden in zwei unterschiedliche Gruppen gegliedert, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung hauptsächlich zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), welche lokale Entzündungsreaktionen durch das Sezernieren von Zytokinen wie $TNF-\alpha$ oder $IFN-\gamma$ vorantreiben sowie infizierte, entartete oder fremdartige Zellen durch die gerichtete Sekretion von Perforinen oder Granzymen abtöten. Sie sind der Hauptbestandteil der zellulären adaptiven Immunantwort [5]. Im Gegensatz dazu differenzieren $CD4^+$ T-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung primär zu sogenannten T-Helferzellen, wobei abhängig von der Zytokin-Umgebung und der Stärke der Aktivierung unterschiedliche Subtypen von Effektor-T-Helferzellen entstehen können, die wiederum individuell auf das die Immunantwort auslösende Pathogen zugeschnitten sind. Die Funktionen unterschiedlicher T-Helferzellen umfassen unter anderem die direkte Interaktion mit und die Aktivierung von B-Zellen, was die humorale Immunantwort einleitet und verstärkt (T_H2 -Lymphozyten), sowie die Unterstützung der zellulären adaptiven Immunantwort und die Kontrolle von Zellen des angeborenen Immunsystems (T_H1 -Lymphozyten). Zudem überwachen regulatorische T-Zellen die Intensität sowie Dauer der entsprechenden Immunantwort [6].

1.1.3 Eine zielgerichtete Migration sowie die dynamische Rezirkulation von Leukozyten sind essentielle Grundlagen für das Immunsystem

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei dem Immunsystem um ein dezentralisiertes Organ, dessen Bestandteile über den ganzen Körper verteilt sind. Ein funktionelles Immunsystem hängt jedoch von einem schnellen und direkten Eingreifen von Immunzellen des angeborenen Immunsystems am Ort der Infektion sowie von der direkten Kommunikation zwischen verschiedenen Immunzelltypen ab. Das bedeutet, dass bestimmte Leukozyten zu gegebener Zeit an bestimmte Orte innerhalb des Körpers wandern müssen. Aus diesem Grund zirkulieren beispielsweise ruhende T-Zellen, auch unter homöostatischen Bedingungen, ständig zwischen peripherem Blut und sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten oder Milz, auf der Suche nach dem passenden, spezifischen Antigen ([7], Abbildung 1.1). Um diesen Prozess zu gewährleisten, müssen Immunzellen

in der Lage sein, schnell und wirksam ihr Adhäsions- und Migrationsverhalten der entsprechenden Umgebung anzupassen. Um aus dem Blut in Lymphknoten einzuwandern, müssen ruhende Lymphozyten beispielsweise in hochendothelialen Venolen (HEVs) an die das Gefäß auskleidenden kubisch gefomten Endothelzellen binden und anschließend aktiv durch die Gefäßwand migrieren, während sie an anderen Stellen im Blutkreislauf in ihrem Adhäsions- und Migrationsverhalten passiv bleiben müssen [8]. Im Lymphknoten angekommen, müssen die T-Zellen ihre Motilität aufrechterhalten, um die vielen verschiedenen Antigene, welche auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie dendritischen Zellen präsentiert werden, zu scannen. Treffen sie dann auf eine APC mit dem zu ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) passenden Antigen, adhären sie wiederum fest an diese, werden aktiviert und beginnen mit der klonalen Expansion ([9], Abbildung 1.1).

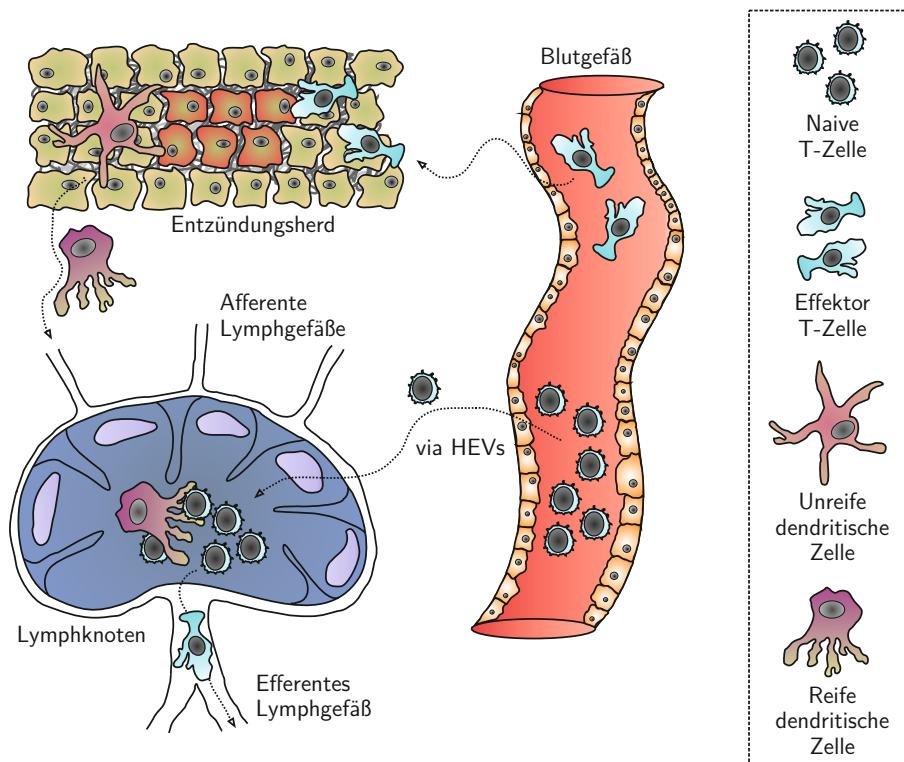


Abbildung 1.1: **Schematische Darstellung der Dynamik von Leukozyten am Beispiel von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten.** Ruhende T-Zellen zirkulieren zwischen dem Blutkreislauf und sekundären lymphatischen Organen auf der Suche nach dem passenden Antigen. Unreife dendritische Zellen durchlaufen nach der Begegnung mit einem Pathogen einen Reifungsprozess und wandern von der Peripherie in ableitende sekundäre Lymphorgane, um die aufgenommenen und prozessierten Antigene gegenüber T-Zellen zu präsentieren. Nach einer erfolgreichen Antigen-spezifischen Begegnung einer APC und einer T-Zelle erfolgt die klonale Expansion der T-Zelle, wobei schließlich Effektor-T-Zellen über den Blutstrom zum Herd der Infektion wandern, um diese vor Ort zu bekämpfen. Abbildung erstellt nach Gong, Linderman & Kirschner, 2014 [10].

Zuvor musste jedoch auch die dendritische Zelle erst in den Lymphknoten migrieren. Im unreifen Zustand patrouillieren diese Zellen in der Peripherie auf der Suche nach eingedrungenen Pathogenen. Sie weisen dabei eine langsame Art der Fortbewegung sowie eine hohe endozytotische Aktivität auf. Nach ihrer Aktivierung, ausgelöst durch die Begegnung mit einem Pathogen, beginnt die dendritische Zelle dann einen Reifungsprozess, in dessen Rahmen sie ihre Motilität drastisch erhöht und die Expression von Chemokinrezeptoren induziert, welche sie durch den interstitiellen Extrazellularraum und über afferente Lymphgefäße in die ableitenden Lymphknoten führen, wo sie ihre aufgenommenen, prozessierten Antigene gegenüber T-Lymphozyten präsentieren kann ([11], Abbildung 1.1). Im Anschluss an die klonale Expansion der aktivierten T-Zelle wandern dann die entstandenen Effektor-T-Zellen über efferente Lymphgefäße aus dem Lymphknoten aus und gelangen über den *Ductus thoracicus* wieder in den Blutkreislauf. Die Effektor-T-Lymphozyten müssen nun am aktivierten Endothel nahe der Entzündung aus den Blutgefäßen austreten, was wiederum eine schnelle Adaption in ihrem Adhäsions- und Migrationsverhalten, gesteuert durch Signale in ihrer Umgebung, voraussetzt. Nach der erfolgten Extravasation wandern die Effektor-T-Zellen schließlich zum Herd der Entzündung, wo sie eine spezifische Immunantwort einleiten oder weiter unterstützen und so für die Beseitigung der Infektion sorgen ([12], Abbildung 1.1).

1.2 Zelladhäsion und -migration von Immunzellen

1.2.1 Zelladhäsion

Unter der Adhäsion (lat. *adhaerere* - „anhaften“) von Zellen versteht man einen Prozess, welcher die Interaktion und das Anhaften von Zellen an Substrate oder andere Zellen vermittelt. In einem multizellulären Organismus wie dem Menschen ist die Zelladhäsion somit von essentieller Bedeutung, da sie eine wichtige Grundlage für die Entstehung und Integrität komplexer Gewebe darstellt. Vermittelt wird die Zelladhäsion durch transmembrane oder in der Membran verankerte Glykoproteine, welche aus der Zelle herausragen und als Zelladhäsionsmoleküle bezeichnet werden. Zu den wichtigsten Gruppen zählen hierbei die Selektine, Cadherine und Integrine [13]. Cadherine, welche primär Ca^{2+} -abhängige und homophile Bindungen eingehen, vermitteln vorzugsweise Zell-Zell-Kontakte, was unter anderem sehr wichtig für die Integrität von Epithelien ist [14]. Für die Adhäsion von Immunzellen spielen Cadherine jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Die Immunzelladhäsion wird dagegen vorzugsweise von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine (in geringerem Maße auch von Selektinen) vermittelt. Die meisten Integrine binden an Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Fibronektin oder Kollagen, und stellen somit Zell-Matrix-Kontakte her. Integrine, welche die

Fähigkeit besitzen Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche anderer Zellen zu binden, werden dagegen exklusiv auf Immunzellen exprimiert [15].

Die meisten Zelltypen müssen dauerhaft adhärent sein und gehen in einen programmierten Zelltod über, falls sie ihre Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte verlieren und somit „heimatlos“ werden (Anoikis) [16]. Dieser Prozess zeigt, dass die meisten Zelladhäsionsmoleküle nicht nur als reine mechanische Anker, sondern auch als Rezeptoren für extrazelluläre Signale dienen, die sie in das Innere der Zelle weiterleiten [17]. Während bei den meisten Geweben die Anoikis als Schutzmechanismus vor der Entstehung von metastasierenden Krebszellen unerlässlich ist und ein Entkommen entarteter Zellen aus diesem Prozess fatale Folgen haben kann, können Leukozyten auch ohne eine Bindung über Zelladhäsionsmoleküle und den daraus resultierenden Signalen über längere Zeit überleben, beispielsweise während ihrer Zirkulation im Blut [18]. In diesem Stadium sind Immunzellen nicht adhärent. Wie jedoch bereits beschrieben (Abschnitt 1.1.3, Abbildung 1.1), müssen die verschiedenen Immunzelltypen schnell auf äußere Signale reagieren können und ihr Adhäsionsverhalten entsprechend anpassen, wie bei der Extravasation aus Blutgefäßen oder der Formation der immunologischen Synapse.

1.2.2 Zellmigration

Unter der Migration (lat. *migrare* - „wandern“) von Zellen versteht man die Lokomotion von einzelnen Zellen oder ganzen Zellverbänden, also einen aktiven Ortswechsel. Anders als bei der Zelladhäsion sind jedoch nicht alle Zellen in einem mehrzelligen Organismus dazu in der Lage effektiv zu migrieren. Immunzellen, deren Aufgaben stark von ihrer dynamischen Bewegung innerhalb des Körpers abhängig sind, können als professionell migrierende Zellen angesehen werden. Zellmigratorische Prozesse haben aber auch außerhalb des Immunsystems wichtige Funktionen, unter anderem bei der Embryogenese oder Wundheilung. Auch im pathologischen Kontext, zum Beispiel im Zusammenspiel mit dem Überwinden der Anoikis, spielt die Zellmigration eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Krebszellen [19].

Die meisten Erkenntnisse über die zellbiologischen Grundlagen der Zellmigration stammen von *in vitro*-Studien an mesenchymal migrierenden Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, auf 2-dimensionalen Oberflächen. Während der Zellmigration ist eine räumlich und zeitlich exakte Regulation von Signalkaskaden und Polarisierungsprozessen von entscheidender Bedeutung, wobei in dem klassischen Modell der Zellmigration ein Zyklus aus vier unterschiedlichen Schritten beschrieben wird. Dabei ist die Vorwärtsbewegung der Zelle abhängig von der Polymerisierung des F-Aktin-Zytoskeletts, welches am Vorderende der Zelle Membranprotrusionen wie Lamellipodien oder Filopodien bildet und die

Zellmembran nach vorne schiebt. Anschließend werden Integrin-basierte Adhäsionskomplexe an den neu gebildeten Membranprotrusionen geformt, die mit der Zeit zu großen Fokaladhäsionen reifen. Die die Adhäsion vermittelnden transmembranen Integrine koppeln dadurch das extrazelluläre Substrat an das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett, was durch verschiedene Adaptermoleküle wie beispielsweise Talin, welches Integrine und F-Aktin verbindet, gewährleistet wird. Der krafterzeugende Apparat innerhalb der Zelle, das Aktomyosin, erzeugt nun eine Kontraktion der Zelle, die durch die Integrine auf das extrazelluläre Substrat übertragen werden kann. Dadurch zieht die Zelle sich an dem Substrat entlang. Schließlich kommt es am Hinterende der Zelle zu einer De-Adhäsion und die Zelle bewegt sich vorwärts [20].

1.2.3 Zellmigration von Leukozyten

Im Bereich der Zellmigration gibt es große Unterschiede zwischen Immunzellen und den meisten anderen Zelltypen. Während das klassische Modell der Zellmigration auf die meisten Zellen zutrifft, welche auf 2-dimensionalen Oberflächen migrieren, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass abhängig von Zelltyp, Proteom und Umgebung auch andere Migrationsmodi angewendet werden können. Insbesondere Immunzellen, welche *in vivo* Gewebe unterschiedlichster Architektur durchqueren müssen, sind extrem anpassungsfähig und nicht immer auf das klassische Zusammenspiel aus Protrusion, Adhäsion, Kontraktion und De-Adhäsion angewiesen [21]. Immunzellen verwenden den sogenannten amöboiden Migrationsmechanismus, welcher im Vergleich zu der mesenchymalen Migration wesentlich schneller ist (bis zu 30 $\mu\text{m}/\text{min}$), nicht auf der Verwendung von großen Fokaladhäsionen beruht und die Gewebe-Integrität schont [22]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Leukozyten innerhalb von komplexen und räumlich beengenden 3-dimensionalen Umgebungen, wie dem Interstitium *in vivo* oder einem Kollagen-Gel *in vitro*, sogar ganz ohne den Einsatz von Integrinen weiterhin effektiv migrieren können [23, 24, 25]. Die fehlende Adhäsion der Leukozyten kann dabei schlicht durch eine erhöhte F-Aktin-Polymerisierung ausgeglichen werden [26]. Ein weiteres Charakteristikum der amöboiden Migration von Immunzellen ist deren, wie der Name schon sagt (griechisch *amoibe* - „Wechsel“), ständige Veränderung ihrer Morphologie, wobei am Vorderende F-Aktin-basierte Pseudopodien und am Hinterende ein sogenannter Uropod ausgebildet werden [27]. Immunzellen müssen im Körper schnell und gezielt migrieren, was durch sogenannte Chemokine gesteuert wird, die über an heterotrimere G-Proteine gekoppelte transmembrane Chemokinrezeptoren auf die reagierenden Leukozyten wirken. Migrieren Leukozyten entlang eines löslichen Chemokingradienten, welcher sie an gewünschte Orte innerhalb des Körpers lenkt, wird dies als Chemotaxis bezeichnet. Die Chemokinese hingegen beschreibt die durch uniform vorhandene Chemokine induzierte Migration von

Zellen, welche auf Grund des fehlenden Gradienten jedoch ungerichtet ist und schlicht die Motilität der Zelle erhöht [28].

1.2.4 Extravasation von Leukozyten

Die Extravasation von Leukozyten ist ein gutes Beispiel für einen Prozess, bei dem ein gut koordiniertes Zusammenspiel aus Adhäsion und Migration erforderlich ist. Zudem wird dabei auch verdeutlicht, wie schnell Immunzellen von einem nicht-adhäsiven Zustand in einen Zustand stabiler Adhäsion wechseln können. Wie bereits erwähnt, findet die Extravasation von Leukozyten während unterschiedlicher physiologischer Prozesse statt. Einerseits wandern ruhende Lymphozyten über hochendotheliale Venolen (HEVs) aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe aus, um diese nach einer APC mit passendem Antigen zu durchsuchen. Andererseits findet die Extravasation jedoch auch im Rahmen einer Entzündung statt, wenn Zellen des angeborenen Immunsystems oder Effektor-Lymphozyten an einem aktivierten Endothel den Blutkreislauf verlassen und zum Ort der Infektion migrieren, um diese effektiv zu bekämpfen. Erste Interaktionen zwischen den im Blut befindlichen Leukozyten und den die Gefäße auskleidenden Endothelzellen werden dabei von Selektinen (auf Endothelzellen exprimiert) und ihren Liganden, beispielsweise PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*, auf Leukozyten exprimiert), vermittelt [29]. Dies führt zu einem Einfangen der Leukozyten und einer Annäherung der beiden Zelltypen. Da immernoch vom Blutstrom mitgerissen, rollen die Leukozyten anschließend auf der Oberfläche der Endothelzellen entlang, was dazu führt, dass sie Chemokine, welche dort präsentiert werden, über entsprechende Chemokinrezeptoren wahrnehmen können. Die Aktivierung von Integrinen ist die Folge, welche für eine stabile Anhaftung der Immunzelle sorgt, die wiederum in einer festen Adhäsion resultiert. Wichtig für diesen Prozess sind vor allem die auf den Leukozyten exprimierten Integrine LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen 1*) und VLA-4 (*Very Late Antigen 4*), die ihre Liganden ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) und VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), entsprechende Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, auf der Oberfläche von Endothelzellen binden [30]. Schließlich kommt es zu einer Stärkung der Bindung durch intrazelluläre Signalkaskaden, welche unter anderem über Tyrosinkinasen der Src-Familie vermittelt werden. Das F-Aktin-Zytoskelett wird zudem mit Hilfe kleiner Rho-GTPasen wie Rac1 umstrukturiert und die Zelle beginnt, auf der Oberfläche der Endothelzellen entlangzukriechen und diese zu scannen. Den passenden Ort gefunden, startet die Immunzelle die transendotheliale Migration, welche auch als Diapedese bezeichnet wird. Diese kann parazellulär, also zwischen den einzelnen Endothelzellen, aber auch transzellulär, also durch die entsprechenden Endothelzellen hindurch, erfolgen. Nachdem letztendlich noch die Basalmembran überwunden

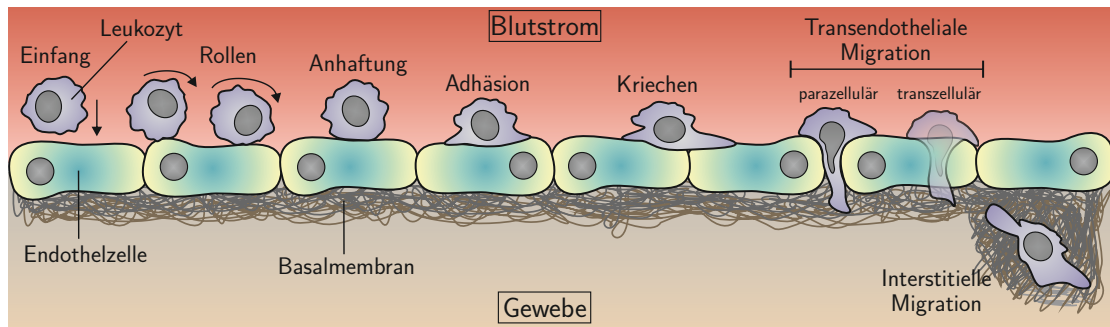


Abbildung 1.2: **Schematische Darstellung der Leukozyten-Extravasation aus Blutgefäßen.** Bei der Extravasation von Immunzellen handelt es sich um einen komplexen und mehrstufigen Prozess. Erste Interaktionen zwischen Leukozyten und Immunzellen werden über Selektine und ihre Liganden vermittelt, was in einem Einfangen der Immunzellen an der Endothelzellschicht resultiert. Das Entlangrollen der Leukozyten auf den Endothelzellen führt schließlich zu einer Chemokin-induzierten Aktivierung von Integrinen und somit zu einer stabilen Adhäsion. Schließlich kriechen die Immunzellen auf der endothelialen Oberfläche entlang, bis die transendotheliale Migration erfolgt, welche parazellulär oder transzellulär ausgeführt werden kann. Nachdem die Diapedese durch die Endothelzellschicht und die darunter befindliche Basalmembran abgeschlossen ist setzt die Immunzelle ihre Migration zu ihrem Bestimmungsort fort. Abbildung erstellt nach Nourshargh, Hordijk & Sixt, 2010 [8].

wurde, welche aus extrazellulärer Matrix besteht und sich an die Endothelzellschicht anschließt, migrieren die Immunzellen in den Geweben weiter zu ihren entsprechenden Bestimmungsorten ([12], Abbildung 1.2).

1.3 Integrine

1.3.1 Funktion und Struktur von Integrinen

Zelladhäsionsmoleküle aus der Familie der Integrine sind glykosylierte, transmembrane Heterodimere, welche aus einer α - und einer nicht kovalent assoziierten β -Kette bestehen (Abbildung 1.3). Fast alle Zellen mehrzelliger Organismen exprimieren Integrine, und selbst in Prokaryoten können homologe Sequenzen zu Integrin-Untereinheiten gefunden werden. Das frühe Auftreten sowie die Konservierung dieser Moleküle während der Evolution unterstreichen deren Wichtigkeit für biologische Prozesse [31]. So spielen Integrine unter anderem bei der Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen, der Wundheilung, der Embryogenese aber auch bei effektiven Immunantworten eine essentielle Rolle, wobei die meisten dieser Funktionen auf die Rolle von Integrinen in der Zelladhäsion und -migration zurückzuführen sind [32]. In Säugetieren sind mittlerweile 8 verschiedene α - und 18 verschiedene β -Untereinheiten bekannt. Da nicht alle α - und β -Ketten dimerisieren können, sind bisher nur 24 verschiedene Integrin-Heterodimere beschrieben worden, von denen 7 exklusiv auf Leukozyten exprimiert werden [33].

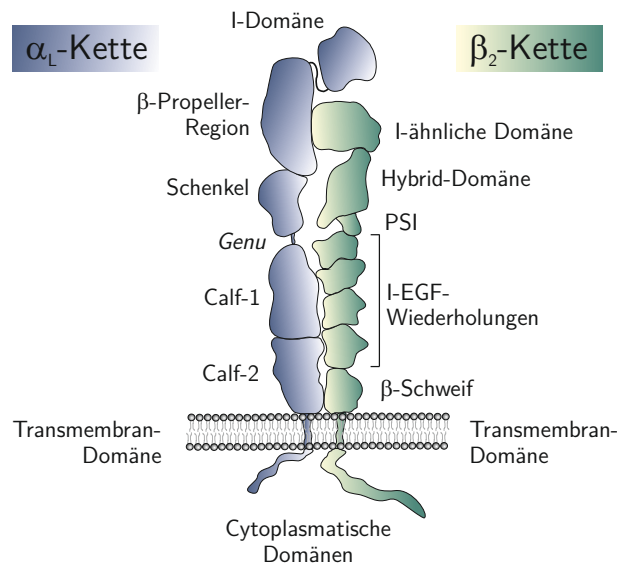


Abbildung 1.3: **Strukturelle Darstellung eines Integrin-Heterodimers am Beispiel von LFA-1.** Integrine sind heterodimere Transmembran-Proteine welche aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Der Hauptteil des Proteins liegt außerhalb der Zelle, wohingegen die Transmembran- und die cytoplasmatischen Domänen einen kleineren Teil der Proteine ausmachen. Abbildung erstellt nach Kinashi, 2005 [33].

Eines dieser Immunzell-spezifischen Integrine ist LFA-1 (*Leukocyte Function-associated Antigen 1*, CD11a/CD18, Integrin $\alpha_L\beta_2$), dessen struktureller Aufbau in Abbildung 1.3 dargestellt ist. LFA-1 wird auf allen Leukozyten exprimiert, wobei dem Protein essentielle Aufgaben in der Vermittlung von angeborener und adaptiver Immunität zukommen. Die Liganden für LFA-1 sind ICAM-1, -2, -3, -4 und -5, wobei ICAM-1 den wichtigsten Bindungspartner darstellt (*InterCellular Adhesion Molecule 1*). Die 180 kDa große α -Untereinheit von LFA-1 (CD11a) weist eine I-Domäne am extrazellulären N-Terminus auf, die nur 9 der 18 Integrin- α -Ketten besitzen. Die I-Domäne von LFA-1 enthält die sogenannte MIDAS-Domäne (*Metal-Ion-Dependent Adhesion Site*), welche abhängig von divalenten Kationen eine Schlüsselposition in der Bindung von LFA-1 an den Liganden ICAM-1 einnimmt. An die I-Domäne schließt sich eine 7-blättrige β -Propeller-Region an, gefolgt von drei β -Sandwich-Domänen (Schenkel, Calf-1 und Calf-2) und einer kurzen Transmembran- sowie einer cytoplasmatischen Domäne. Die 90 kDa große β -Untereinheit von LFA-1 (CD18) besitzt eine N-terminale I-ähnliche Domäne (welche ebenfalls eine MIDAS-Domäne enthält), gefolgt von einer Hybrid- und einer PSI-Domäne. Dem schließen sich 4 Cystein-reiche Integrin-EGF-ähnliche Wiederholungen sowie ein β -Schweif an. Ebenso wie die α -Kette weist die β -Kette jeweils eine kurze Transmembran- sowie cytoplasmatische Domäne auf, wobei die auf der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne befindliche Sequenz NPXF als Bindestelle für das wichtige Adapterprotein Talin dient ([15, 32, 33], Abbildung 1.3).

Integrine besitzen eine sogenannte bidirektionale Signalgebung, wobei man hierbei zwischen *inside-out* und *outside-in* Signalen unterscheidet. Während die *inside-out* Signalgebung Prozesse umfasst, welche Integrine und damit die Zelladhäsion aktivieren beziehungsweise kontrollieren (Abschnitt 1.3.2), beschreibt die *outside-in* Signaltransduktion die Fähigkeit von Integrinen, auch als Signal-gebende Rezeptoren zu dienen und durch Bindung an ihre entsprechenden Liganden intrazelluläre Signalkaskaden mit weitreichenden Folgen zu induzieren [34]. Meist laufen diese Signalkaskaden über die Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie sowie FAK (*Focal Adhesion Kinase*) und dessen hämatopoetischem Homolog Pyk2 (*Protein Tyrosine Kinase 2*) und können großen Einfluss auf Prozesse wie Zellmigration, Proliferation, Zytokin-Sekretion oder De-Granulation haben [35].

Wie wichtig Integrine für das Immunsystem sind, wird durch die erbliche Krankheit LAD (Leukozyten-Adhäsions-Defizienz) deutlich. Patienten, die an dieser autosomal rezessiven Krankheit leiden, weisen Mutationen in Genen auf, welche beispielsweise die β_2 -Integrin-Kette oder den Integrin-Aktivator und -Adapter Kindlin3 codieren. Dies kann zu einer massiven Adhäsionsdefizienz von Leukozyten führen, welche sich in einer starken Leukozytose und Immundefizienz auswirkt. Patienten sterben meist in jungen Jahren an starken wiederkehrenden Infektionen, die nicht mehr effektiv bekämpft werden können [36, 37].

1.3.2 Mechanismen der Integrin-Aktivierung

Wie bereits erwähnt, sind Immunzellen Spezialisten darin, ihre Integrin-vermittelte Adhäsion schnell und effektiv an ihre sich stetig verändernden Umgebungen anzupassen. Besonders fallen hierbei T-Lymphozyten auf, welche im ruhenden Zustand nicht adhären te Suspensionszellen sind, nach entsprechender Stimulation aber unmittelbar ihre Integrine aktivieren und somit feste Adhäsionen auf Integrin-Liganden eingehen können. Dieser als *inside-out* Signalkaskade bezeichnete Prozess kann durch verschiedene externe Stimuli ausgelöst werden und umfasst komplexe intrazelluläre Signalkaskaden [38]. So können beispielsweise Chemokine wie CXCL12, welche an ihre auf den Lymphozyten exprimierten zugehörigen Chemokinrezeptoren binden (im Falle von CXCL12 ist das der Rezeptor CXCR4), über heterotrimere G-Proteine entsprechende Signalkaskaden auslösen, die aktivierend auf Integrine wirken [39, 40]. Auch Signalkaskaden über den T-Zell-Rezeptor (TCR), nach dessen erfolgreicher Bindung an den passenden Komplex aus Antigen und MHC-Molekül (*Major Histocompatibility Complex*), führen zu einer Aktivierung von Integrinen [41]. *In vitro* kann dies beispielsweise durch den Einsatz von aktivierenden monoklonalen Antikörpern gegen Bestandteile des TCRs (z.B. CD3) sowie gegen dessen co-stimulatorisches Protein CD28 ausgelöst werden. Eine weitere Möglich-

keit, in einem *in vitro* Zellkultur-Versuch Integrine zu aktivieren, ist durch die Zugabe des Diacylglycerol-Strukturanalogs PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat). Das Phorbol-12-myristat-13-acetat kann dabei direkt durch die Plasmamembran diffundieren und die Proteinkinase C (PKC) aktivieren, wobei die sonst initial benötigte Signalgebung durch transmembrane Rezeptoren wie dem TCR oder Chemokinrezeptoren umgangen wird [35]. Die Aktivierung von Integrinen kann dabei über zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen beeinflusst werden, welche einerseits die Affinität der einzelnen Integrin-Moleküle für ihre Liganden und andererseits die Valenz der Integrine auf der Zelloberfläche, also deren *Clustering*, kontrollieren ([42], Abbildung 1.4).

Die Affinitätsregulation von Integrinen beschreibt einen Prozess, bei welchem einzelne Integrin-Moleküle durch Konformationsänderungen die Bindungsaffinität für ihre spezifischen Liganden anpassen. Unterschieden werden hierbei hauptsächlich drei Stadien der Affinität, welche von niedrig über intermediär bis hoch reichen. Während Integrine mit niedriger Affinität eine Konformation aufweisen, bei der die N-terminalen Kopfstück-Regionen der Integrinmoleküle in Richtung der Plasmamembran abgewinkelt sind und welche gerade einmal 5 nm aus der Membran herausragen, zeichnen sich die Konformationen intermediärer und hoher Affinität durch ausgestreckte Integrinmoleküle aus, bei denen die Ligandenbindungsstellen wesentlich besser zugänglich sind und welche 20 bis 25 nm von der Membran abstehen ([33], Abbildung 1.4). Ein Knotenpunkt im Wechsel zwischen der Konformation niedriger Affinität zu den ausgestreckten Konformationen ist die Knieregion der α -Kette (*Genu*, Abbildung 1.3), welche abgewinkelt oder gestreckt sein kann. Der Konformationswechsel von intermediärer zu hoher Affinität wird schließlich durch eine Separation der beiden Integrin-Ketten in den Regionen nahe der Plasmamembran eingeleitet, welche dann durch die I-ähnliche Domäne der β -Kette auf die I-Domäne der α -Kette übertragen wird und dort zu einer Abwärtsbewegung der siebten α -Helix führt, was eine Öffnung des Integrin-Kopfstückes und bessere Zugänglichkeit der MIDAS-Domäne, also der Liganden-Bindungsstelle, zur Folge hat [43].

Im Gegensatz dazu beschreibt die Valenzregulation der Integrin-Aktivität die räumliche Anhäufung von Integrinmolekülen an bestimmten Stellen der Plasmamembran, was auch als Integrin-*Clustering* bezeichnet wird. Durch die gezielte Anhäufung der Adhäsionsrezeptoren an bestimmten Stellen auf der Plasmamembran können somit starke, multivalente Bindungen mit Liganden eingegangen werden, was zu einer Induktion oder Verstärkung der Zelladhäsion führt [44]. Meist beginnend mit kleinen Mikro-*Clustern* im nm-Bereich, können Integrin-*Cluster* zu riesigen *Patch*-ähnlichen Anhäufungen reifen, wie beispielsweise im Rahmen der T-Zellaktivierung [33].

Obwohl der Prozess der Integrin-Aktivierung in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht wurde, sind bis heute die genauen räumlich-zeitlichen Beiträge von Affinitäts-

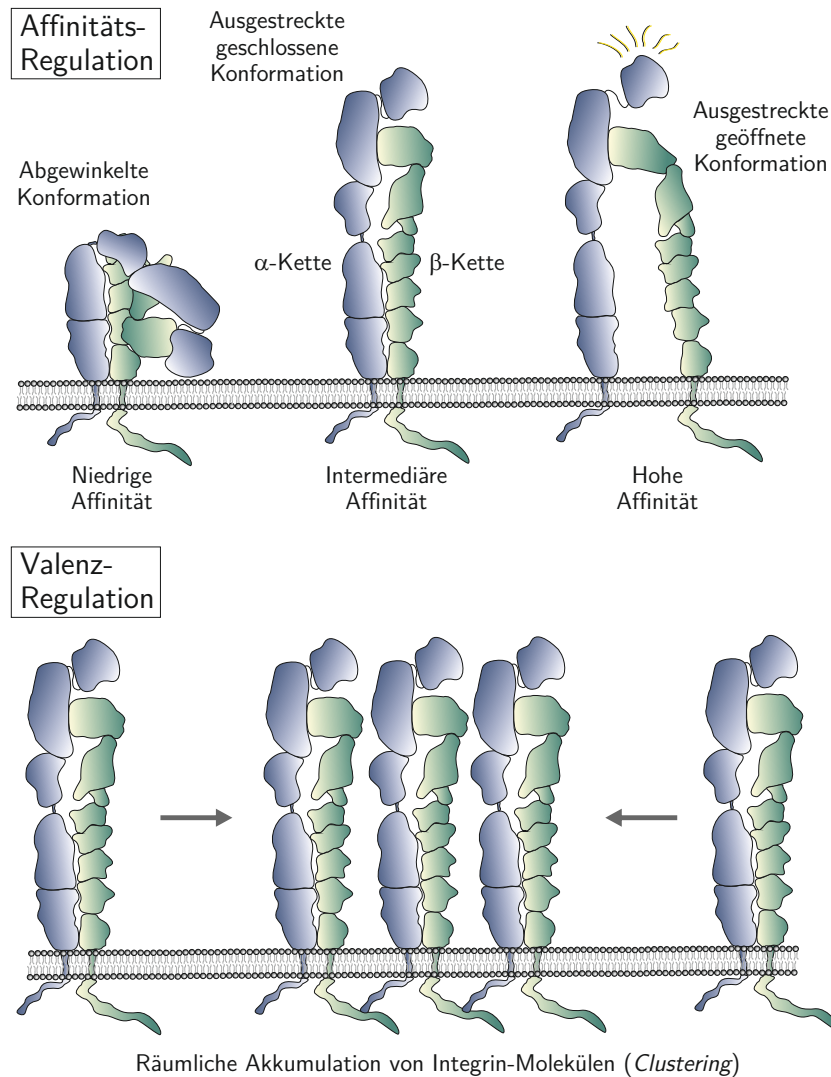


Abbildung 1.4: **Schematische Darstellung der Affinitäts- sowie Valenzregulation der Integrin-Aktivität.** Grundsätzlich werden zwei verschiedene Mechanismen der Integrin-Aktivierung unterschieden, die Affinitäts- sowie die Valenzregulation. Die Affinitätsregulation beschreibt eine Konformationsänderung der einzelnen Integrinmoleküle. Eine abgewinkelte Konformation, bei der die N-terminalen Kopfstück-Regionen der Integrinmoleküle in Richtung der Plasmamembran gerichtet sind, hat eine schwache Bindungsaffinität für den entsprechenden Integrin-Liganden und ist bei inaktiven Integrinen vorzufinden. Streckt sich das Integrinmolekül von der Plasmamembran ab, ist jedoch noch geschlossen, spricht man von einer intermediären Bindungsaffinität. Eine hohe Affinität wird schließlich erst durch eine weitere Konformationsänderung erreicht, bei der sich die beiden Integrin-Ketten etwas voneinander entfernen und welche daher auch als geöffnete Konformation bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu beschreibt die Valenzregulation die räumliche Anhäufung von Integrin-Molekülen auf der Zelloberfläche, was auch als *Clustering* bezeichnet wird. Dies gewährleistet multivalente Interaktionen zwischen Integrinen und ihren Liganden. Auch wenn das Integrin-*Clustering* keine Änderungen in der Konformation der Integrinmoleküle voraussetzt, ist hier die ausgestreckte Konformation dargestellt. Abbildung erstellt nach Kinashi, 2005 [33].

und Valenzregulation nicht genau geklärt und werden immer wieder kontrovers diskutiert [45, 46, 47, 48, 49]. Während die Affinitätsregulation von Integrinen mittlerweile sehr gut verstanden und erforscht ist und eine Vielzahl von zytoplasmatischen Adapterproteinen, wie beispielsweise Talin oder die Proteine der Kindlin-Familie robust in der Regulation der Integrin-Affinität impliziert sind, ist über Mechanismen die Integrin-Valenzregulation wesentlich weniger bekannt [37, 50]. Interessanterweise wurde jedoch die kleine GTPase Rap1 (*Ras-related Protein 1*), welche in aktiviertem Zustand ihre Funktionen über verschiedene Effektoren wie RIAM oder RapL ausführt und somit ein breites Wirkungsspektrum hat, sowohl in der Regulation der Integrin-Affinität als auch der Integrin-Valenz beschrieben [51].

1.3.3 Integrin-Aktivierung durch die kleine GTPase Rap1

Rap1 (*Ras-related Protein 1*) ist eine kleine GTPase aus der Superfamilie der Ras-GTPasen, wobei in Säugetieren zwei verschiedene Isoformen (Rap1a und Rap1b, 95 % Sequenz-Homologie) exprimiert werden, welche in ihren Funktionen teilweise redundant sind [52]. Generell spielt Rap1 in Leukozyten eine wichtige Rolle bei der Regulation von Integrin-vermittelter Adhäsion, Migration und Polarisierung [53, 54, 55]. Dabei wirkt Rap1, wie alle kleinen GTPasen, als molekularer Schalter in bestimmten Signaltransduktionsprozessen. Ist das Protein an Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, befindet es sich in einem inaktiven Zustand. Wird GDP gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht, geht Rap1 in einen aktiven Zustand über und kann mit Hilfe spezifischer Effektor-Proteine, welche es nur in GTP-assoziiertem Zustand binden kann, Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Prozesse nehmen. Um zwischen aktivem und inaktivem Zustand zu alternieren, brauchen kleine GTPasen wie Rap1 jedoch Unterstützung von anderen Proteinen. Sogenannte Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) vermitteln den Austausch von GDP zu GTP und schalten kleine GTPasen somit an. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) dagegen aktivieren, wie der Name schon sagt, die GTPase-Aktivität kleiner GTPasen, wodurch diese das gebundene GTP unter Abspaltung eines Phosphat-Restes zu GDP hydrolysieren und somit wiederum inaktiviert werden ([56], Abbildung 1.5).

Bekannte GAPs für Rap1 sind beispielsweise Spa-1 sowie Rap1GAP1. Zu den GEFs für Rap1 zählen unter anderem RapGEF1 (C3G), RapGEF2 (PDZ-GEF1), RapGEF3 (Epac) sowie RasGRP2 (CalDAG-GEF I) [57]. RapGEF1, welches durch Kinasen der Src-Familie an Tyrosin504 phosphoryliert und dadurch in seiner GEF-Aktivität für Rap1 aktiviert werden kann, war dabei das erste beschriebene GEF für die kleine GTPase Rap1 [58, 59, 60]. Zudem wurde RapGEF1, welches konstitutiv mit dem Adapter-Protein Crk-L assoziiert ist, in der Regulation von Integrin-vermittelter Adhäsion sowie Integrin-

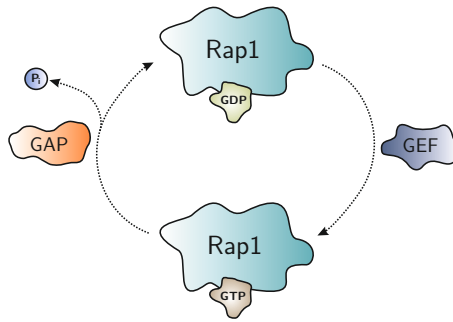


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus von Rap1.** Rap1 kann wie ein molekularer Schalter in seiner Aktivität an- und ausgeschaltet werden. Dies geschieht, indem das Enzym zwischen einem GDP- und einem GTP-gebundenen Zustand alterniert. Ist GDP gebunden, befindet sich Rap1 in einem inaktiven Zustand, durch die Bindung von GTP wird es aktiviert und wirkt über spezifische Effektorproteine auf zelluläre Prozesse. Kleine GTPasen benötigen jedoch Hilfe, um diesen Zyklus zu durchlaufen. Sogenannte Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) vermitteln den Austausch von GDP zu GTP und schalten das Enzym somit an. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) sind die Gegenspieler der GEFs und aktivieren die GTPase-Aktivität der Enzyme, wodurch diese das gebundene GTP unter Abspaltung eines Phosphat-Restes zu GDP hydrolysieren und somit inaktiviert werden. Abbildung erstellt nach Gloerich & Bos, 2011 [57].

Clustering in T-Lymphozyten impliziert [61].

Wie bereits erwähnt wirken kleine GTPasen in ihrem aktivierten Zustand über eine Vielzahl unterschiedlicher Effektor-Proteine, deren Zell-spezifische Expressionsmuster auch unterschiedliche Wirkungsweisen der Enzyme in verschiedenen Geweben erklären können. Zu den Rap1-Effektor-Proteinen, welche wichtige Aufgaben in Zellen des hämatopoetischen Systems haben, gehören RapL (*Regulator of Adhesion and Polarization enriched in Lymphocytes*), RIAM (*Rap1-GTP-Interacting Adapter Molecule*), Mst1 (*Mammalian Ste-20-like Kinase 1*) und RalGDS (*Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator*) [62, 63, 64, 65]. Während Rap1 beispielsweise in Epithelzellen auch Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte reguliert und bei ontogenetischen Prozessen wie der Embryogenese und Angiogenese eine wichtige Rolle spielt [66], wird die Funktion des Proteins in Zellen des Immunsystems vor allem mit der Regulation der Integrin-Aktivität in Verbindung gebracht [67]. Dabei kann Rap1, abhängig von der Interaktion mit unterschiedlichen Effektor-Proteinen, auf verschiedene Weise Einfluss auf Integrine nehmen ([68], Abbildung 1.6).

RapL ist ein wichtiger Effektor von Rap1 und insbesondere in Lymphozyten, in denen es stark exprimiert wird, von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus Rap1-GTP und RapL die Migration und Adhäsion von Leukozyten durch die Aktivierung des Integrins LFA-1 reguliert. Besonders stark impliziert wird der Rap1-GTP-RapL-Komplex dabei in der Regulation der Integrin-Valenz [62, 70]. Zudem konnte eine direkte Interaktion von RapL und der zytoplasmatischen Domäne der α -Untereinheit

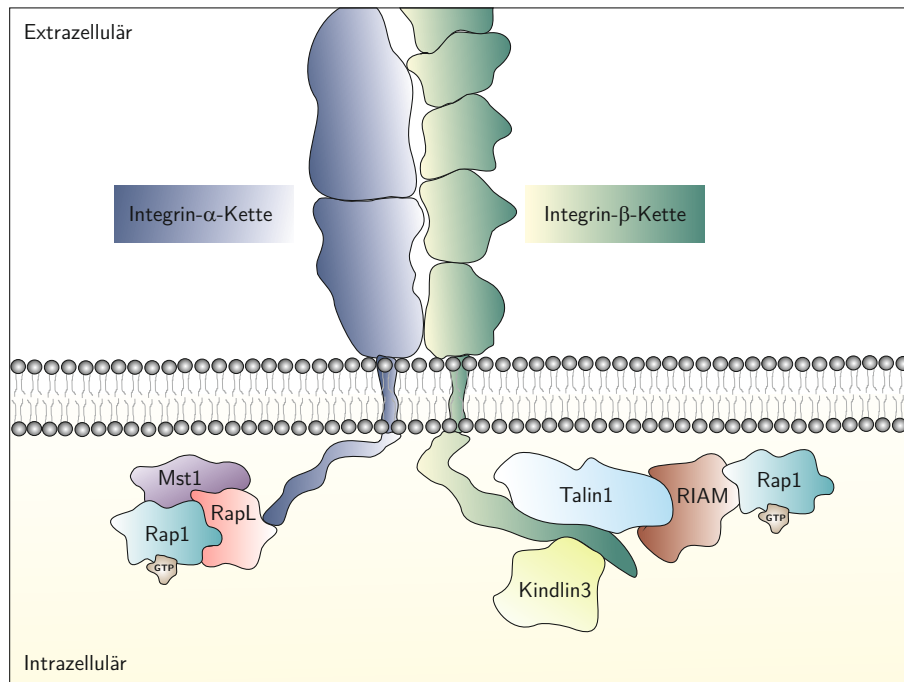


Abbildung 1.6: **Schematische Darstellung der Rap1-vermittelten Integrin-Aktivierung.** Rap1-GTP kann auf verschiedene Weise Einfluss auf die Aktivierung von Integrinen nehmen. Einerseits kann es als Teil des Rap1-GTP-RapL-Mst1-Komplexes über RapL direkt an die zyttoplasmatische Domäne der Integrin- α -Kette binden, andererseits wurde die Interaktion des Rap1-GTP-RIAM-Komplexes mit dem Integrin-Aktivator Talin1 als Grundvoraussetzung für die Rekrutierung von Talin1 an die zyttoplasmatische Domäne der β -Integrin-Kette beschrieben. Abbildung erstellt nach Zhang & Wang, 2012 [69].

von LFA-1 nachgewiesen werden [71]. Die Kinase Mst1 kann zusätzlich den Rap1-GTP-RapL-Komplex binden und somit ebenfalls Einfluss auf Integrin-*Clustering* sowie Adhäsion und Polarisierung von Lymphozyten nehmen ([64], Abbildung 1.6). Neben den Adapter-Molekülen Talin1 und Kindlin3 wird Rap1 zudem auch eine wichtige Funktion bei der Regulation der Integrin-Affinität zuteil. Insbesondere für das auf Thrombozyten stark exprimierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus Rap1-GTP und dessen Effektor RIAM die Rekrutierung des universellen Integrin-Aktivators Talin1 an die zyttoplasmatische Domäne der entsprechenden Integrin- β -Untereinheit vermittelt, was zu einer Integrin-Aktivierung durch entsprechende Konformationsänderungen der Integrin-Moleküle führt ([72, 73, 74], Abbildung 1.6).

1.4 Die große GTPase Dynamin2

1.4.1 Die Familie der Dynamin-ähnlichen Proteine

Shpetner *et al.* entdeckten 1989 ein unbekanntes, 100 kDa großes Enzym, welches mit Mikrotubuli aus den Gehirnen von Kälbern co-präzipitierte. Sie gaben dem Protein den Namen Dynamin [75]. Schnell wurde klar, dass es sich bei Dynamin um eine mechanochemische GTPase handelt [76]. Durch Studien in dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* konnte bereits 1991 gezeigt werden, dass das vor kurzem entdeckte Protein wichtige Funktionen in der Endozytose und dem intrazellulären Vesikeltransport hat [77, 78]. Heute, fast 30 Jahre später und nach intensiver Forschung, ist das Wissen um die große GTPase Dynamin sowie nah verwandter Proteine enorm angestiegen. Es wurden mittlerweile drei verschiedene Isoformen der Dynamin-Proteine in Säugern beschrieben, welche den gleichen zu Grunde liegenden Domänen-Aufbau sowie, mit circa 80 %, eine hohe Gesamt-Homologie aufweisen [79, 80]. Der Unterschied zwischen den Isoformen liegt vor allem in deren Expressionsmuster. Dynamin1, das 1989 entdeckte und am stärksten untersuchte Dynamin, ist in hohen Leveln ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert [81]. Im Gegensatz dazu ist Dynamin2 ubiquitär exprimiert [82], während die Expression von Dynamin3 primär auf Gehirn, Hoden und Lunge beschränkt ist [80]. Zudem weisen die unterschiedlichen Dynamin-Isoformen teilweise auch verschiedene Affinitäten zu Protein-Bindungspartnern auf [83] und können sich in ihrer GTPase-Aktivität, Oligomerisierungs-Effizienz sowie ihren Membran-bindenden Eigenschaften unterscheiden [84].

Neben den klassischen Dynaminen wird noch eine Reihe weiterer Proteine zu der Familie der Dynamin-ähnlichen Proteine gezählt, wie beispielsweise Drp1, Mitofusin und Opa1, welche wichtige Funktionen bei der Teilung und Fusion von mitochondrialen Membranen spielen [85]. Den Mitgliedern der Dynamin-ähnlichen Proteinfamilie ist generell gemein, dass sie Membranen umbauen können und basale Eigenschaften in ihrem Aufbau teilen. Zudem durchlaufen alle Mitglieder der Protein-Familie Nukleotid-abhängige Dimerisierungen (oder Polymerisierungen), welche zu intramolekularen Konformationsänderungen führen und dadurch die intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität regulieren. Im Gegensatz zu den kleinen GTPasen benötigen Dynamin-ähnliche Proteine zudem keine Hilfe von externen GEFs oder GAPs [86, 87].

1.4.2 Aufbau und Struktur von Dynamin2

Dynamin2 ist ein zytoplasmatisches, 100 kDa großes Protein, das wie bereits erwähnt ubiquitär exprimiert wird und von großer physiologischer Bedeutung ist, was auch durch

die frühe embryonale Letalität von Dynamin2-defizienten Mäusen verdeutlicht wird [88]. Dynamin2 wird anhand seiner Primärstruktur in folgende Domänen eingeteilt: eine N-terminale G-Domäne, eine Mittel-Domäne, eine PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie), eine GED-Domäne (GTPase-Effektor) sowie eine C-terminale PRD-Domäne (Prolin-reiche-Domäne, Abbildung 1.7 A). Studien über die Tertiärstruktur von Dynamin weisen auf eine Haarnadel-ähnliche Faltung des Proteins hin [89, 90]. Dabei sitzt die G-Domäne wie eine Art Kopf auf einer Halsregion, welche durch drei α -Helices aus den N- und C-terminalen Bereichen der G-Domäne sowie dem C-terminalen Bereich der GED-Domäne gebildet wird. Daran schließt sich die „Stiel“-Region des Proteins an, welche sich aus α -Helices der Mittel- sowie dem N-terminalen Bereich der GED-Domäne zusammensetzt. Schließlich bildet die PH-Domäne den „Fuß“ des gefalteten Proteins (Abbildung 1.7 A, B). Die PRD-Domäne, von der angenommen wird, dass sie ungefaltet bleibt, ragt an der Grenzfläche zwischen Hals-Region und G-Domäne heraus ([80], nicht dargestellt in Abbildung 1.7 B).

Die aminoterminal G-Domäne, auch als GTPase-Domäne bezeichnet, beinhaltet, wie der Name schon sagt, die intrinsische GTPase-Funktion von Dynamin2, bindet die Nukleotide und ist hoch konserviert zwischen den verschiedenen Dynamin-Isoformen. Der „Stiel“, welcher aus Mittel- und GED-Domäne gebildet wird, ist für die Dimerisierung von Dynamin2 verantwortlich, wobei die G-Domänen innerhalb eines Dynamin2-Dimers in entgegengesetzte Richtungen orientiert sind (Abbildung 1.7 B). Diese Dimerisierung resultiert in einer basalen Dynamin2-Dimer-Einheit und ist nicht zu verwechseln mit der Nukleotid-abhängigen Dimerisierung zweier G-Domänen. Zwei Dynamin2-Dimere bilden dann wiederum ein Tetramer, ebenfalls vermittelt über die „Stiel“-Regionen der Proteine (Abbildung 1.7 B). In diesem Zustand liegt Dynamin2 hauptsächlich in Lösung vor [91]. Die Tetramere können dann, über dieselben Interaktionen der „Stiel“-Regionen, große Oligomere bilden, welche sich helikal um tubuläre Membranstrukturen legen ([80], Abbildung 1.7 B). Neben ihrem Anteil an der Formation der „Stiel“-Region hat die GED-Domäne zusätzlich die Aufgabe, die interne GTPase-Aktivität von Dynamin2 zu aktivieren und steht in engem physischen Kontakt zur G-Domäne [92]. Die PH-Domäne von Dynamin2 vermittelt durch ihre positive Ladung eine Bindung an Phospholipide (vor allem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)), was zu einer Membranrekrutierung von Dynamin2 führt und von großer Bedeutung für die Funktion der GTPase ist [93]. Die C-terminale PRD-Domäne, welche, wie der Name schon sagt, eine große Anzahl Prolin-reicher PXXP-Aminosäuremotive enthält, ist vor allem für die Vermittlung von Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich. Dabei bindet Dynamin2, meist über besagte PXXP-Motive, an Src-Homologie-3-Domänen (SH3-Domänen) seiner Interaktionspartner [80].

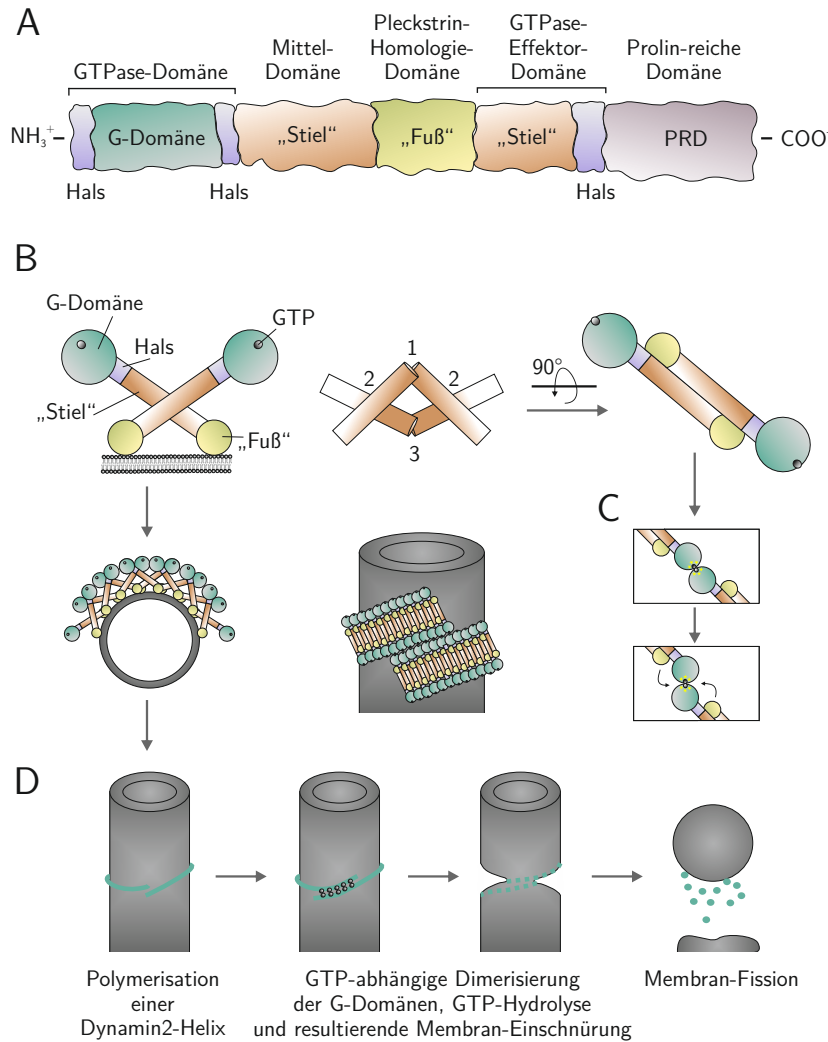


Abbildung 1.7: **Aufbau von Dynamin2 sowie vermuteter Mechanismus Dynamin2-vermittelter Membran-Teilung.** (A) Lineare Darstellung der Domänenstruktur von Dynamin2. Domänen, welche im gefalteten Zustand des Proteins in die gleiche Region lokalisieren, sind in gleicher Farbe dargestellt. (B) Schematische Darstellung eines Dynamin2-Dimers sowie helikal angeordneter Dynamin2-Polymere an einer tubulären Membran in zwei unterschiedlichen Orientierungen (mit einer 90°-Rotation dazwischen). Das Farbmuster der Domänen ist zugehörig zu (A). Es wird angenommen, dass die hier nicht dargestellten PRD-Domänen aus der polymerisierten Helix herausragen. Die Dynamin2-Polymerisation ist das Ergebnis der Interaktion zwischen den „Stielen“ von Dynamin2-Monomeren (Schnittstelle 2) und Dynamin2-Dimeren (Schnittstelle 1 und 3). Die GTP-abhängige Dimerisierung der G-Domänen zwischen aneinandergrenzenden Stufen der Dynamin2-Helix aktiviert vermutlich dessen intrinsische Polymer-abhängige GTPase-Aktivität, was zu einer Membran-Einschnürung und schließlich -Teilung führt. (C) Vermutete, relativ zur G-Domäne stattfindende Hebel-ähnliche Bewegung des Dynamin2-Halses, welche GTP-Hydrolyse-abhängig ist. (D) Schematische Darstellung der oben gezeigten essentiellen Schritte, welche zur Dynamin2-vermittelten Teilung von Membranen führen. Abbildung erstellt nach Ferguson & De Camilli, 2012 [80].

1.4.3 Wirkmechanismus von Dynamin2 in der Clathrin-vermittelten Endozytose

Obwohl es auch Studien gibt, welche Dynamin2 in Prozessen Clathrin-unabhängiger Endozytose sowie Membranabschnürungen an intrazellulären Membrankompartimenten implizieren [94, 95], spielt Dynamin2 hauptsächlich eine wichtige Rolle in der Clathrin-abhängigen Endozytose [96]. Dabei fällt Dynamin2 primär die Aufgabe zu, Clathrin-beschichtete Einstülpungen an der Plasmamembran abzuschnüren [97]. Eine schematische Darstellung der mutmaßlichen Wirkweise von Dynamin im Abschnürungsprozess von Vesikeln ist in Abbildung 1.7 B-D dargestellt. Dabei geht man davon aus, dass sich die bereits in Abschnitt 1.4.2 erwähnten Dynamin2-Tetramere zu einem Oligomer zusammenschließen, welches sich als eine Helix um den Hals einer Clathrin-beschichteten Einschnürung legt. Bei diesem Prozess binden jeweils die GTP-gebundenen G-Domänen aneinanderliegender Helix-Sprossen des Dynamin2-Oligomers aneinander (Abbildung 1.7 B), wodurch die intrinsische GTPase-Aktivität von Dynamin2 aktiviert wird und schließlich die einzelnen Proteine eine Konformationsänderung im Bereich der G-Domäne und dem Hals durchlaufen, welche einer Art Hebelbewegung gleichkommt ([98], Abbildung 1.7 C). Dies resultiert vermutlich in einer rotierenden Gleitbewegung der benachbarten und durch die G-Domänen verbundenen Dynamin2-Helix-Sprossen zueinander, was zu einer Abschnürung der Clathrin-beschichteten Einstülpung führt ([99], Abbildung 1.7 D). Obwohl durch zellfreie Studien gezeigt werden konnte, dass aufgereinigtes Dynamin2 *in vitro* ohne Zugabe anderer Proteine und in Anwesenheit von GTP tubuläre Membranen teilen kann [100], wird angenommen dass *in vivo* weitere Proteine zu der Dynamin-vermittelten Membranteilung beitragen. Zu diesen zählt unter anderem das F-Aktin-Zytoskelett, welchem die Aufgabe zuteil wird, den Hals der Clathrin-beschichteten Einschnürung einzuengen und zu verlängern [101].

1.4.4 Einfluss von Dynamin2 auf das F-Aktin-Zytoskelett sowie Zellmigration und -adhäsion

Es gibt Hinweise darauf, dass ein Zusammenspiel zwischen Dynamin2 und dem F-Aktin-Zytoskelett nicht nur für den Vorgang der Endozytose eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von Dynamin und Aktin einen generellen Einfluss auf die Polymerisierung von F-Aktin hat [102]. Zudem sind verschiedene Bindungspartner von Dynamin2 in der Lage, gleichzeitig auch das F-Aktin-Zytoskelett zu binden und zu regulieren. So wurde beobachtet, dass eine Interaktion von Dynamin2 mit Cortactin oder mAbp1 ebenfalls Einfluss auf die Dynamik des F-Aktin-Zytoskeletts nimmt [103, 104]. Dynamin2 konnte außerdem an verschiedenen F-Aktin-haltigen Struk-

turen nachgewiesen werden, wie beispielsweise an Lamellipodien [105], dorsalen Membrankräuselungen [106], der immunologischen Synapse [107], Invapodien [108], Podosomen [109] sowie Aktinschweiften [110]. Trotz dieser zahlreichen Befunde ist der genaue Wirkmechanismus von Dynamin2 auf die F-Aktin-Dynamik bisher noch nicht ausreichend geklärt worden.

Eine derart enge Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett, wie sie bei Dynamin zu beobachten ist, legt die Vermutung nahe, dass die große GTPase Einfluss auf Zell-dynamische Prozesse wie die Migration nehmen könnte. In der Tat wird Dynamin2 durchaus mit der Motilität von Zellen in Verbindung gebracht [111]. So stabilisiert Dynamin2 in der Lungenkrebs-Zelllinie H1299 beispielsweise zusammen mit Cortactin Mikrofilamente in Filopodien und reguliert so die Migration dieser Zellen [112]. Auch die Invasion pankreatischer Krebszellen wird durch Dynamin2 reguliert. Hierbei stabilisiert die große GTPase das GEF Vav1 durch dessen direkte Bindung und nimmt somit Einfluss auf die Aktivität der kleinen GTPase Rac1 und dadurch auf F-Aktin-Dynamiken [113]. Ebenfalls in der murinen Fibroblasten-Linie NIH3T3 reguliert Dynamin2 die Zellmigration durch seinen Einfluss auf das F-Aktin-Zytoskelett [114]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von Dynamin2 zu einer erhöhten Invasion und Migration von Krebszellen sowie Tenozyten führt [115, 116]. Doch auch neben seiner Rolle in der Regulation des F-Aktin-Zytoskeletts kann Dynamin2 auf Grund seiner Funktion in Endozytose sowie der Regulation von Membran-Dynamiken Einfluss auf die Zellmigration nehmen [111].

Die Migration von Zellen auf 2-dimensionalen Oberflächen ist abhängig von der Integrin-vermittelten Adhäsion an diese, welche den Kraft-erzeugenden Apparat innerhalb der Zelle mit seiner Umgebung koppelt (Abschnitt 1.2.2). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Dynamin2 auch über die Regulation von Adhäsionsprozessen Einfluss auf die Migration von Zellen nehmen kann [111]. So ist der dynamische Umbau von Fokalladhäsionen, großen Proteinkomplexen an der basalen Plasmamembran in langsam migrierenden mesenchymalen Zellen, von der Aktivität der großen GTPase abhängig [117]. Dynamin2 interagiert bei diesem Prozess direkt mit FAK (*Focal Adhesion Kinase*), welche wiederum an die Tyrosinkinase Src bindet. Dieser trimere Komplex vermittelt dann schließlich, spezifisch an Fokalladhäsionen, die Internalisierung von Integrinen mittels Clathrin-vermittelter Endozytose und sorgt somit für den Abbau der großen Adhäsionskomplexe [118]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Dynamik von Podosomen, großen Aktin-basierten Strukturen mit Funktionen in Zellmotilität, -invasion und -adhäsion, in Osteoklasten ebenfalls durch Dynamin2 reguliert wird [119, 120].

Interessanterweise wurde die Rolle von Dynamin2 in Migrations- und Adhäsionsprozessen bisher ausschließlich in mesenchymal migrierenden, stark adhärenen Zelltypen un-

tersucht [121, 111]. Die meisten Immunzellen sind im Gegensatz dazu schnell migrierende amöboide Zellen, welche keine großen und langlebigen Adhäsionsstrukturen wie Fokaladhäsionen oder Podosomen ausbilden und deshalb sehr unterschiedliche zu Grunde liegende Regulationsmechanismen bezüglich ihrer Motilität und Adhäsion aufweisen ([21], ausgenommen immature dendritische Zellen und Makrophagen). Die genaue Rolle der großen GTPase Dynamin2 ist in diesen physiologisch so wichtigen Prozessen daher bis heute unbekannt.

1.4.5 Bisher beschriebene Funktionen von Dynamin2 in T-Lymphozyten

Auch wenn die Rolle von Dynamin2 in der Integrin-vermittelten Adhäsion von T-Zellen bisher nicht untersucht wurde, wurden trotzdem einige wenige Studien durchgeführt, die sich mit Funktionen der großen GTPase in T-Lymphozyten beschäftigen. So beschrieben Gomez *et al.* eine wichtige Rolle von Dynamin2 in der Aktivierung von T-Zellen, welche sie durch die Interaktion von Dynamin2 mit dem Rho-GEF Vav1 und dessen Einfluss auf die Polymerisierung von F-Aktin an der immunologischen Synapse erklärten [107]. Ein Einfluss der großen GTPase auf die Internalisierung des T-Zell-Rezeptors (TCRs) konnte in dieser Studie explizit nicht nachgewiesen werden. Dem widerspricht eine Veröffentlichung von Willinger *et al.*, in welcher gezeigt werden konnte, dass Dynamin2 durch seine Funktion in der Endozytose die Internalisierung des TCRs vermittelt und somit den ersten Schritt für eine anhaltende TCR-Signalgebung von intrazellulären Membranen aus einleitet, welche wichtig für die klonale Expansion von T-Zellen sowie deren Metabolismus ist [122]. Weitere Studien beschreiben Funktionen für Dynamin2 in der Aufnahme des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ 1 über direkte T-Zell-T-Zell-Transmission [123] sowie in der spezifischen Regulation von CCR5-vermittelter T-Zell-Chemotaxis [124]. Obwohl Mutationen innerhalb des Dynamin2-Gens vor allem mit Morbus Charcot-Marie-Tooth (hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ 1, [125]) sowie der zentronukleären Myopathie (angeborene Muskelerkrankung, [126]) in Verbindung gebracht werden, zeigen aktuelle Studien, dass auch die Entwicklung einer T-Linien Akuten Lymphatischen Leukämie (T-ALL) durch Mutationen in sowie einer erhöhten Expression von Dynamin2 gefördert werden kann [127, 128, 129]. Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen Dynamin2-Defizienz leiden zudem unter einer Lymphopenie auf Grund eines gestörten Auswanderungsverhaltens der Lymphozyten beziehungsweise Thymozyten aus Lymphknoten beziehungsweise Thymus, was die Autoren der Studie auf eine gestörte Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor-Internalisierung zurückführen, jedoch ohne das Adhäsionsverhalten der Dynamin2-defizienten T-Zellen zu analysieren [130].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen ist hoch konserviert und tritt bereits zu Beginn der Entstehung der Metazoa auf [131]. Dies verdeutlicht, dass es sich dabei um einen essentiellen Prozess handelt, der unter anderem für die Organogenese, Gewebestabilität, Wundheilung und Blutgerinnung von größter Wichtigkeit ist. Auch das Immunsystem, ein dezentralisiertes Organ, dessen zelluläre Bestandteile über den ganzen Körper verteilt sind, ist stark abhängig von Integrin-vermittelter Zelladhäsion. So bildet diese eine wichtige Grundlage für die Fähigkeit von Leukozyten, sich in dynamischer Art und Weise durch verschiedenste Gewebe zu bewegen oder an diesen festzusetzen, unter anderem während der Extravasation aus dem Blutstrom [8]. Da Immunzellen in manchen Situationen stark adhären müssen und in anderen wiederum nicht, können sie die Adhäsivität ihrer Integrine schnell der entsprechenden Umgebung anpassen. Dies können sie einerseits über die Integrin-Affinität, andererseits über die Integrin-Valenz regulieren [15]. Das Krankheitsbild LAD (Leukozyten-Adhäsions-Defizienz) verdeutlicht in drastischer Weise was passiert, wenn die Integrin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten nicht mehr gewährleistet werden kann. Patienten, die an LAD erkrankt sind, leiden unter rezidivierenden Infekten und sterben ohne Behandlung meist in jungen Jahren [132]. Doch auch im funktionellen Zustand können Integrine auf Leukozyten, wenn auch eher indirekt, an pathologischen Prozessen beteiligt sein. Dies ist beispielsweise bei den Autoimmunerkrankungen Multiple Sklerose sowie Morbus Crohn der Fall, die mit monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Lymphozyten-Integrine behandelt werden können [133]. Dadurch wird verdeutlicht, dass ein exaktes Wissen um die molekularen Mechanismen, die der Regulation von Integrinen zu Grunde liegen, von großer medizinischer Wichtigkeit ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss der großen GTPase Dynamin2 auf die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Zellen sowie entsprechende zu Grunde liegende molekulare Mechanismen untersucht werden. Dynamin2 wurde bisher vor allem im Kontext von Endozytose und F-Aktin-Polymerisierung studiert, konnte aber auch schon in pathologischen Prozessen mit Integrin-Beteiligung, wie der Migration und Invasion von Krebszellen, impliziert werden [112, 113, 115, 134]. Erkenntnisse über einen weiteren molekularen Schalter der Integrin-Aktivierung könnten dazu beitragen, neue Therapeutika für Krankheiten zu entwickeln, welche direkten Bezug zu der Funktion von Integrinen haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegeldokumentation	Gel Max, Intas (Göttingen)
Autoklav	Model 135T, H+P (Oberschleißheim)
Automatischer Zellseparator	AutoMACS Pro, Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Bakterien-Schüttler	innova44, New Brunswick, Eppendorf (Hamburg)
Blotapparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Drehrad	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Durchflusszytometer (FACS)	BD CantoII, BD Biosciences (Heidelberg)
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Polymehr (Paderborn)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektrophorese-Netzteil	EV-243, Consort (Turnhout, Belgien)
Elektroporator	GenePulser Xcell + CE-Modul, Biorad (München)
	Amaza Nucleofector I, Lonza (Basel, Schweiz)
Elektrowaage	JB2002-G, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Feinwaage	AG285, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Heiz- und Magnetrührer	Combimac RCT, IKA (Staufen)
Magnetständer	DynaMag-2 Magnet, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Mikroskope	Axiovert 100, Zeiss (Jena)
	Eclipse TE2000-E, Nikon (Tokio, Japan)
	Eclipse TS100, Nikon (Tokio, Japan)
Mikroskope (<i>Laser-Scanning</i> , konfokal)	FluoView 1000, Olympus (Tokio, Japan)
	LSM 5 LIVE, Zeiss (Jena)
	LSM 880 + Airyscan, Zeiss (Jena)
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy HT Multimode-Reader, BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)

Netzgeräte für Elektrophorese	Elite300Plus, Schütt Labortechnik (Göttingen)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Middleton, USA)
	ErgoLine, StarLab (Ahrensburg)
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro, Brand (Wertheim)
Präparierbesteck	FST Dumont Biology (Schweiz)
Protein-Minigel-Apparaturen	BioRad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München)
Rollenmischer	RS-TR05, Phoenix Instrument (Garbsen)
Scanner	Scan Maker 8700, Microtek (Hsinchu, Taiwan)
Spritzen-Pumpsystem	AL1000, World Precision Instruments (Berlin)
Sterilbank für Zellkulturarbeiten	Bioflow, BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Thermocycler	iCycler iQ5, Biorad (München)
	MyCycler, Biorad (München)
Vakuumpumpe	AC, HLC BioTech (Bovenden)
Vortex Mixer	UNIMAG ZX3, VELP scientifica (Mailand, Italien)
Wasserbad	WNE, Memmert (Schwabach)
Wippe	WS-10, Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Zellkulturinkubator	Binder (Great River, USA)
Zentrifugen	Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München)
	Centrifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5810R, Eppendorf (Hamburg)
	Multifuge 4KR, Heraeus instrument GmbH (München)
	Optima LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (München)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (15 mm)	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
<i>Dynabeads</i> (Protein G oder A)	ThermoFisher Scientific (USA)
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Biozym (Wien, Österreich)
FACS-Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Filterspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Immunfluoreszenzkammern (μ -Slide 8-Loch)	Ibidi (München)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kapillarspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Küvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Luer-Konnektor (verschiedene)	Ibidi (München)
Mikrokanäle (μ -Slide VI ^{0.4} , μ -slide I Luer Familie)	Ibidi (München)
Mikroskopieschalen Glas	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Mikroskopieschalen Plastik (μ -dish)	Ibidi (München)
Nitrozellulosemembran	PROTRAN, Schleicher & Schuell (Dassel)
Nylon-Mikrofilter (40 μ m)	BD Biosciences (Heidelberg)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Pasteurpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
PCR-Platten (96-Loch)	PeqLab (Erlangen)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikpipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Polypropylen-Reaktionsgefäße	StarLab (Ahrensburg)
qPCR-Folie	PeqLab (Erlangen)
Röntgenfilm	GE-Healthcare (Freiburg)
Silikonschlauch	Ibidi (München)
Sterilfilter (0,2 μ m; 0,45 μ m)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Spritzen	Braun (Melsungen)
<i>Transwell</i> -Einsätze (3 μ m)	Corning (Lowell, USA)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturplatten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

6x Ladepuffer	ThermoFisher Scientific (USA)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar	BD (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ammoniumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Antipain	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
1-Butanol	Merck (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CXCL12 (human)	Peptrotech (Hamburg)
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
λ -DNA/EcoRI + HindIII Marker Nr.3	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNAse I	Roche (Basel, Schweiz)
Dynasore	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dynole 31-2	Abcam (GB)
Dynole 34-2	Abcam (GB)
Ethanol	VWR (Frankreich)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Exo1	Tocris (Bristol, UK)
Fast DIO (3,3'-Dilinoleyloxacarbocyanin-Perchlorat)	ThermoFisher Scientific (USA)
Fibronektin, human	Harbor Bio-Products (USA)

Ficoll, human (Pancoll, 1,077 g/ml)	Pan Biotech (Aidenbach)
Fluoroshield	ImmunoBioScience (USA)
Hot Start Real Time Mix	PeqLab (Erlangen)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
ICAM-1/Fc Fusionsprotein (human)	Zellüberstand (CV-1, AG Kolanus)
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kollagen I (Pure Col)	Advanced Biomatrix (San Diego, USA)
Latrunculin A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LB	Carl Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Monodansylcadaverin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Grüssing (Filsing)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
Phalloidin (TRITC oder Alexa488)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenol	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>Phusion</i> 5x GC-Puffer	ThermoFisher Scientific (USA)
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific (USA)
Precision Plus Protein All Blue Standard	BioRad (München)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
RibonukleaseA (RNase A)	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Saponin	Carl Roth (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIzol-Reagenz	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
VCAM-1/Fc Fusionsprotein (human)	Zellüberstand (HEK293T, AG Kolanus)

2.1.4 Kommerzielle Reaktionssysteme (Kits)

Active Cdc42 Pull-Down and Detection Kit	ThermoFisher Scientific (USA)
Active Rap1 Pull-Down and Detection Kit	ThermoFisher Scientific (USA)
Amaxa Human T Cell Nucleofector Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
CD4 Microbeads	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD19 Microbeads	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Waltham, USA)
NK cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific (USA)
Pierce ECL (verbesserte Chemilumineszenz) Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific (USA)

2.1.5 *TaqMan*-qPCR-Sonden

Zielgen	Bezeichnung/Sequenz	Hersteller
18S	for: 5'-GATCCATTGGAGGGCAAGTCTG-3' rev: 5'-ACGAGCTTTTAACTGCAGCAACTTTA-3' Sonde: 5'-CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT-3'	Eurofins
Dynamin1	Hs00189369_m1	Applied Biosystems
Dynamin2	Hs00974698_m1	Applied Biosystems
Dynamin3	Hs00399015_m1	Applied Biosystems
GAPDH	4352934E	Applied Biosystems

2.1.6 SiRNAs

Zielgen	Hersteller	Sequenz
Dynamin2 (human, Oligo1)	Dharmacon (Lafayette, USA)	5'-GGUGCCUGUAGGUGAUCAA(dTdT)-3'
Dynamin2 (human, Oligo2)	Dharmacon (Lafayette, USA)	5'-GCACUCUGUAUUCUAUUA(dTdT)-3'
Renilla (Kontrolle)	Dharmacon (Lafayette, USA)	5'-AAACAUGCAGAAAUGCUG(dTdT)-3'

2.1.7 Plasmide

Name	Resistenz	Referenz
pEGFP-N1-Dynamin2	Kanamycin	<i>Insert</i> kloniert aus Plasmid #27689 von Addgene [96]
pEGFP-N1-Rap1a Wildtyp	Kanamycin	<i>Insert</i> kloniert aus humaner cDNA-Bibliothek
pEGFP-N1-Rap1a G12V	Kanamycin	<i>Insert</i> kloniert aus humaner cDNA-Bibliothek
pRFP-N1-Lifeact	Kanamycin	Zur Verfügung gestellt von P. Lipp [135]
pRFP-N1-Rap1a Wildtyp	Kanamycin	<i>Insert</i> kloniert aus humaner cDNA-Bibliothek

Der hier verwendete eukaryotische Expressionsvektor pEGFP-N1 (beziehungsweise pRFP-N1) wurde ursprünglich von der Firma Clontech erworben und durch W. Kolanus modifiziert. Die Klonierungskassette wurde so verändert, dass eine Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* ermöglicht wurde. Das entsprechende Fusionsprotein (mit N-terminalem eGFP oder RFP) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors des Zytomegalievirus.

2.1.8 Klonierungsprimer

Die hier verwendeten Primer zur Klonierung von Konstrukten wurden so konstruiert, dass sie mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *NotI* in den Vektor pEGFP-N1 ligiert werden konnten. Dementsprechend wurden die passenden Restriktionsschnittstellen in die Primer eingefügt (*MluI* (ACGCGT) in den Vorwärtsprimer (for), *NotI* (GCGGCCGC) in den Rückwärtsprimer (rev)). Zudem wurde vor den Restriktionsschnittstellen eine sogenannte GC-Klammer integriert (GCGGG), welche die Restriktion erleichtern soll. Die Primer wurden bei der Firma Eurofins bestellt.

Bezeichnung	Sequenz
Dnm2 Hs for	5'-GCGGGG ACGCGT ATGGGCAACCGCGGGATGGAAG-3'
Dnm2 Hs rev	5'-GCGGGG GCGGCCGC CTAGTCGAGCAGGGATGGCTCGG-3'
Rap1a Wiltyp Hs for	5'-GCGGGG ACGCGT ATGCGTGAGTACAAGCTAGTGGTC-3'
Rap1a G12V Hs for	5'-GCGGGG ACGCGT ATGCGTGAGTACAAGCTAGTGGTCCTTGGTTCAG TAGGCGTTG-3'
Rap1a Hs rev	5'-GCGGGG GCGGCCGC CTAGAGCAGCAGACATGATTTCTTTTtagg-3'

2.1.9 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Klon oder Katalognummer	Hersteller
α -AKT	#9272	Cell Signaling
α -phospho-AKT	#4060	Cell Signaling
α -CD3	OKT3	Hybridomüberstand (aufgereinigt)
α -CD11a	MHM24	Dako
α -CD18	#bs-0503R	Bioss
	MEM-48	Exbio
	MHM23	Dako
α -CD28	CD28.05	BD
α -CD29	12G10	Abcam
	MEM101A	Immunotools
α -CD44	IM7	Biolegend
α -CD49d	9F10	eBioscience
α -CD49e	SAM-1	Abcam
α -CD49f	GoH3	BD
α -Crk-L	#sc-319	Santa Cruz
α -CXCR4	12G5	BD
α -Dynammin2	#ab3457	Abcam
α -EEA1	#sc-33585	Santa Cruz

α -Erk1/2	#9102	Cell Signaling
α -phospho-Erk1/2	#9101	Cell Signaling
α -ERM	#3142	Cell Signaling
α -phospho-ERM	#3141	Cell Signaling
α -human-IgG-Fc	#109-005-098	Jackson
α -FAK	#3285	Cell Signaling
α -phospho-FAK	#3283	Cell Signaling
α -GFP	#sc-9996	Santa Cruz
α -Grb2	#sc-255	Santa Cruz
α -Integrin β_7	FIB504	BD
α -LAMP1	#L1418	Sigma-Aldrich
α -Pyk2	#3480	Cell Signaling
α -phospho-Pyk2	#3291	Cell Signaling
α -Rab5A	#sc-309	Santa Cruz
α -Rac1	102/Rac1	BD
α -Rap1	#16120	Thermo Scientific
α -RapGEF1	#sc-17840	Santa Cruz
α -phospho-RapGEF1	#A1120	Assay Bio Tech
α -Ras	Ras10	Millipore
α -phospho-SFKs	#2101	Cell Signaling
α -Talin1	#ab71333	Abcam
α -Tubulin	YL1/2	Millipore
α -Vav	#sc-132	Santa Cruz

Konformationsspezifische oder -induzierende α -Integrin-Antikörper

Antikörper	Klon	Quelle	Funktion
α -CD18	327C	Donald Staunton	Reporter für CD18 hoher Affinität [136]
α -CD18	KIM127	Nancy Hogg	Reporter für CD18 mittlerer Affinität [137]
α -CD18	KIM185	Hybridomüberstand (aufgereinigt)	Bindung induziert CD18 hoher Affinität [138]
α -CD18	mAb24	Nancy Hogg	Reporter für CD18 hoher Affinität [139]

α -CD29	HUTS-4	Millipore	Reporter für CD29 hoher Affinität [140]
----------------	--------	-----------	--

2.1.10 Zellkulturmedien, -seren, -lösungen und -zusätze

Fetales Kälberserum (FBS), hitzeinaktiviert	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Gentamicin 10 mg/ml	PAA (Pasching, Österreich)
<i>Hank's Buffered Salt Solution</i> (HBSS)	PAA (Pasching, Österreich)
HBSS 10x	GIBCO (Eggenstein)
L-Glutamin 100x	PAA (Pasching, Österreich)
Natrium-Bicarbonat	PAA (Pasching, Österreich)
Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA (Pasching, Österreich)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
RPMI 1640	PAA (Pasching, Österreich)
VLE-RPMI 1640	Biochrom (Berlin)
Zellkulturwasser EP-Grad	PAA (Pasching, Österreich)

2.1.11 Komplexe Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
RPMI 1640 ⁺	RPMI 1640 mit L-Glutamin und Phenolrot 10 % (v/v) FBS 40 µg/ml Gentamicin
VLE-RPMI 1640 ⁺	VLE-RPMI 1640 mit L-Glutamin und Phenolrot 10 % (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
VLE-RPMI 1640 Hungermedium ⁺	VLE-RPMI 1640 mit L-Glutamin und Phenolrot 0,5 % (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.1.12 Organismen

Bakterienstamm	DH5 α [141]
Zelllinien	CV-1 (Nierenzelle, <i>Cercopithecus aethiops</i>) [142] HEK293T (Embryonale Nierenzelle, <i>Homo sapiens</i>) [143] Jurkat E6.1 (T-Lymphozyt, <i>Homo sapiens</i>) [144]
Humane Primärzellen (isoliert aus <i>Buffy-Coats</i>)	CD4 ⁺ T-Zellen CD8 ⁺ T-Zellen CD19 ⁺ B-Zellen NK-Zellen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, [145]) wurde angewendet um bestimmte Sequenzabschnitte verschiedener cDNA-Bibliotheken oder bereits vorhandener DNA-Plasmide zu amplifizieren. Die DNA wurde mit Hilfe der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (ThermoFisher Scientific) vervielfältigt, welche eine sehr geringe Fehlerquote und eine hohe Lesegeschwindigkeit aufweist. Pro Ansatz wurden 100 ng *Template*-DNA (10 ng bei Verwendung eines Plasmids), 50 μ M Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 200 μ M Desoxyribonukleotide (dNTPs), 0,4 U *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase sowie 4 μ l 5x *Phusion* GC-Puffer verwendet. Das Endvolumen pro Ansatz, welches durch die Zugabe von doppelt destilliertem Wasser (A. bidest) erreicht wurde, betrug 20 μ l. Im Anschluss erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion nach dem unten gezeigten Schema, wobei die Elongationszeit 30 s pro Kilobase (kb) betrug und somit abhängig von der Länge des Templates variierte. Die Überprüfung des Ergebnisses erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2), wobei 2 μ l pro Ansatz hierfür eingesetzt wurden.

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
initiale Denaturierung	30 s	98 °C	1
Denaturierung	10 s	98 °C	35
Primer-Anlagerung	30 s	60 °C	
Elongation	30 s/kb	72 °C	
terminale Elongation	10 min	72 °C	1
Kühlung	∞	4 °C	1

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele eignen sich aufgrund ihrer Porengröße zum Auftrennen von DNA-Molekülen verschiedener Größen. Da Nukleinsäuren gleichmäßig negativ geladen sind wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist. Kleine DNA-Moleküle sind in der Matrix beweglicher und laufen daher schneller als große. Dies resultiert in der Auftrennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach.

Je nach Größe der nachzuweisenden DNA wurden Agarosegele mit unterschiedlicher Prozentigkeit hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, mit 1 g/ml Ethidiumbromid versehen und anschließend in eine Gelkammer gegossen sowie mit einem entsprechenden Kamm versehen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Proben, versetzt mit 6x Ladepuffer, auf das Gel aufgetragen. Um einen Größenvergleich zu erhalten, wurde zudem auch fraktionierte λ -DNA, verdaut mit EcoRI und HindIII (Fermentas), auf das Gel geladen. TAE-Puffer versetzt mit Ethidiumbromid diente als Laufpuffer und die Auftrennung der Proben wurde für 20 bis 40 min bei 4 Volt/cm durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte schließlich durch in die DNA interkaliertes Ethidiumbromid, welches dadurch seine Emission im Fluoreszenzbereich stark erhöht [146]. Bei Anregung mit UV-Licht konnten so die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und anhand des Markers in dem Gel bezüglich ihrer Größe beurteilt werden.

TAE-Puffer

1 mM EDTA (pH 8)

20 mM Essigsäure

40 mM Tris

2.2.3 Fällung des PCR-Produktes und DNA-Aufreinigung

Die DNA der PCR-Ansätze wurde, je nachdem wie rein diese war, entweder direkt verwendet oder musste zuvor aus einem Agarosegel extrahiert werden. Falls während der PCR nur ein Produkt entstanden war, wurde dieses zur Entfernung der anderen Bestandteile des PCR-Ansatzes gefällt. Dafür wurde der PCR-Ansatz mit A. bidest auf 400 μ l aufgefüllt und mit 300 μ l Phenol-Chloroform (1:1) versetzt. Nachdem die Probe gevortext worden war wurde sie für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden der Probe 40 μ l Lithiumchlorid, 1 μ l Glykogen und 1 ml Ethanol (-20 °C) zugegeben. Für die Fällung wurde die Probe, nachdem alles vermischt worden war, für 20 min bei -20 °C gelagert. Die DNA, welche nun

ausgefallen war, wurde bei 16.000 x g für 10 min abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und im Anschluss in 30 µl A. bidest gelöst. Für den Fall, dass das PCR-Produkt aus einem Gel extrahiert werden musste wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* Kits (Macherey-Nagel) unter Herstellerangaben isoliert.

2.2.4 Restriktionsverdau

Bei allen verwendeten Konstrukten in der vorliegenden Arbeit wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *MluI* (5'-Ende) und *NotI* (3'-Ende) zur Klonierung verwendet. Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um aus Bakterien stammende Endonukleasen, welche Nukleinsäuren sequenzspezifisch schneiden können. Der Doppelverdau erfolgte in den von Fermentas empfohlenen Puffern. Hierfür wurden je 0,5 µl der Enzyme mit 3 µg der DNA sowie 4-8 µl des entsprechenden Puffers (je nachdem ob 1x oder 2x Puffer) in einem Gesamtvolumen von 40 µl in A. bidest aufgenommen, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Hitze inaktiviert. Das Ergebnis wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.2.2).

Enzym	Schnittsequenz	Hitzeinaktivierung
<i>MluI</i>	A / C G C G T	20 min 80 °C
<i>NotI</i>	G C / G G C C G C	20 min 80 °C

2.2.5 Ligation

DNA-Fragmente, welche durch einen Restriktionsverdau mit *MluI* und *NotI* vorbereitet worden waren (PCR-Produkte oder ausgeschnittene Plasmid-*Inserts*), wurden in Vektoren eingefügt, welche ebenfalls mit *MluI* und *NotI* geschnitten worden waren. Ein Ligationsansatz enthielt circa 50 ng Vektor-DNA und 150 ng des DNA-Fragmentes, welches in den Vektor eingefügt werden sollte. Zudem wurden 0,5 U T4-DNA-Ligase in 2 µl Ligasepuffer zugefügt und der Ansatz mit A. bidest auf 20 µl Endvolumen eingestellt. Das Enzym T4-DNA-Ligase schließt die kohäsiven Enden von Vektor und Insert. Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

2.2.6 Bakterienkultur

Escherichia coli Bakterien des Stammes DH5α wurden in sterilisiertem LB-Medium kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm für 16 Stunden geschüttelt.

Plattenkulturen wurden pro Liter Medium mit 10 g Agarose versetzt und im Anschluss bei 37 °C für 16 Stunden kultiviert. Schließlich wurde eine Kanamycin-Selektion (30 µg/ml) durchgeführt.

2.2.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Retransformation bakterieller Plasmid-DNA wurde in chemisch kompetenten *Escherichia coli* Bakterien des Stammes DH5α durchgeführt. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,2 µg Plasmid-DNA versetzt. Darauf folgte eine Inkubation für weitere 5 min auf Eis gefolgt von einem Hitzeschock im Wasserbad für 45 s bei 42 °C. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt und anschließend mit 600 µl LB-Medium ohne Antibiotikum für 1 h bei 37 °C geschüttelt. So konnten die transformierten Bakterien die erhaltene Resistenz umsetzen. Im Anschluss wurden die Bakterien pelletiert, in 120 µl Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 16 Stunden. Die gewachsenen Kolonien wurden direkt weiter verwendet oder auf den Platten bei 4 °C gelagert.

2.2.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide, welche in Bakterien vermehrt wurden, müssen vor ihrer Nutzung in der Zellkultur aufgereinigt werden. Dies wurde sowohl in kleinen Ansätzen (Mini-Präparation) zur Verifizierung des jeweiligen Konstruktes, als auch in großen Ansätzen (Maxi-Präparation) für die Gewinnung einer großen Menge des Plasmids durchgeführt. Beide Techniken basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [147]. Die Maxi-Präparation umfasst zusätzlich eine Aufreinigung durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation, welche zum Erhalt einer großen Menge an reiner, kovalent geschlossener Plasmid-DNA führt [148].

2.2.8.1 Mini-Präparation

Bei diesem Verfahren konnte Plasmid-DNA schnell, jedoch nur im kleinen Maßstab, isoliert werden. Hierfür wurden 4 ml LB-Medium versetzt mit Kanamycin (30 µg/ml) mit einer Einzelkolonie der Selektionsplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Die Kulturen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Daraufhin wurden 400 µl Lösung 2 zugegeben und der Ansatz mehrfach invertiert. Dieser Schritt sollte einen Zeitraum von 5 min nicht überschreiten, da die Bakterien hierbei der alkalischen Lyse ausgesetzt werden. Durch die anschließende Zugabe von 300 µl Lösung 3 und weiterem Invertieren fielen Proteine und chromosomale DNA aus. Diese und weitere Zelltrümmer

wurden für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 300 µl eines 1:1 Phenol-Chloroform-Gemisches wurden hinzugegeben und die Probe mit Hilfe eines Vortexers gemischt. So konnten Proteine, welche sich immernoch in der Probe befanden, entfernt werden. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 16.000 x g, was zu einer Phasentrennung führte. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol vermischt, wodurch die Plasmid-DNA gefällt wurde. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16.000 x g und 4 °C für 12 min. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 30-50 µl A. bidest versetzt mit 0,1 µg/ml RNase A aufgenommen und gelöst.

Lösung 1 10 mM EDTA

Lösung 2 0,2 M NaOH; 1 % SDS

Lösung 3 2,5 M KOAc; 2,5 M HOAc

2.2.8.2 Maxi-Präparation

LB-Medium (11) wurde mit 30 µg/ml Kanamycin versetzt und mit Bakterien angeimpft. Der Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 150 rpm und 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei 4400 x g für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml Lösung 1 resuspendiert und anschließend zur alkalischen Lyse der Bakterien mit 80 ml Lösung 2 versetzt. Die Lyse wurde nach 3 min durch Zugabe von 40 ml Lösung 3 abgestoppt und Proteine sowie chromosomale DNA durch Zentrifugation bei 4400 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde gefiltert, mit 100 ml Isopropanol versetzt und durch Schütteln vermischt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Anschließend wurde die DNA bei 3800 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet nach Trocknung in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 5,5 g CsCl, 100 µl Igepal (10 %) und 500 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Daraufhin wurde der geklärte Überstand in Beckman Quickseal Ultrazentrifugengefäße überführt und durch Verschweißen luftblasenfrei verschlossen. Die Sedimentation in einer Ultrazentrifuge (Optima LE-80K, Rotor NVT100, Beckman Coulter) erfolgte bei 80.000 rpm für 3,5 h. Mit Hilfe einer Spritze konnte anschließend die generierte Plasmid-Bande des Gradienten, welche sich durch eine rote Färbung auszeichnete, abgenommen werden. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 10 ml salzgesättigtem Butanol was zu einer Reinigung der Plasmid-DNA von Ethidiumbromid führte. Schließlich wurde die nun farblose DNA-Lösung mit einem Gemisch aus einem Volumenanteil Ammoniumacetat (1 M) und drei Volumenanteilen 99,8 % (v/v) Ethanol gefällt. Sie wurde bei 4900 x g für 5 min abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Je nach Volumen wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge A. bidest (500 µl bis

1 ml) resuspendiert und die Konzentration der DNA abschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt.

2.2.9 Expressionsanalyse durch quantitative *Real-time*-PCR

Mit der quantitativen *Real-time*-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) kann die Genexpression auf mRNA-Ebene gemessen werden. Dafür wird die mRNA aus Zellen isoliert und im Anschluss durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die eigentliche Messung basiert schließlich auf einer PCR, wobei in den hier dargestellten Versuchen das *TaqMan*-Sondensystem angewendet wurde [149]. Hierbei amplifizieren zwei flankierende Primer einen kurzen cDNA-Abschnitt innerhalb dessen ein modifiziertes Oligonukleotid (Sonde) komplementär binden kann. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende an einen Farbstoff gekoppelt (z.B. 6-Carboxyfluorescein (FAM)), welcher in der intakten Sonde seine Anregungsenergie strahlungsfrei an einen Quencher am 3'-Ende überträgt [150]. Bei jedem PCR-Zyklus wird die an ein Templat gebundene Sonde durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der verwendeten Polymerase zerstört. Hierbei wird der Farbstoff vom Quencher gelöst, woraufhin die Anregung des Farbstoffs zu einer Lichtemission führt, welche im PCR-Gerät detektiert wird. Während der exponentiellen Phase der Reaktion verhält sich die gemessene Lichtintensität proportional zum gebildeten Produkt. Die Zykluszahl jeder Probe, bei der eine spezifische Fluoreszenzintensität überschritten wird, wird gemessen. Durch die Berechnung der Differenz der Zykluszahl zwischen dem untersuchten Gen und einem internen Referenzgen (z.B. GAPDH oder 18S rRNA) ist es schließlich möglich, die relative Menge an mRNA zu Beginn der Reaktion zu ermitteln [151, 152].

2.2.9.1 Aufreinigung von RNA aus Zellen

Humane CD4⁺ T-Zellen wurden in 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen) für 5 min bei RT lysiert [153]. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugefügt und die Lösung durch Schütteln vermischt und für kurze Zeit inkubiert. Für die Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließender Inkubation für 10 min bei RT. Durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C wurde das RNA-Präzipitat abzentrifugiert und im Anschluss mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer kurzen Trocknungsphase wurde das Pellet in 20-50 µl RNase-freiem A. bidest bei 50-60 °C gelöst. Abschließend wurde die Konzentration der RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt.

Um eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die RNA-Proben nach der Aufreinigung mit DNase behandelt. Dazu wurde pro µg RNA der Probe 1 µl DNaseI mit dem entsprechenden Puffer zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte anschließend für 30 min bei 70 °C.

2.2.9.2 cDNA-Synthese

Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers, wobei pro Reaktion 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

2.2.9.3 Quantitative PCR

Die Reaktionen wurden in Triplikaten von je 20 µl Volumen angesetzt. Die zuvor erhaltene cDNA wurde für die Reaktion im Verhältnis 1:10 mit A. bidest gemischt. Für die PCR notwendige Komponenten wie Puffer, Nukleotide und Polymerase wurden durch einen *Real-time-Mastermix* der Firma PeqLab hinzugefügt. Eine Reaktion setzt sich dabei aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

- 10 µl peqGOLD *Hot Start Real-Time Mix*
- 2 µl cDNA (1:10-Verdünnung)
- 1 µl *TaqMan*-Sonde
- 7 µl A. bidest

Die Durchführung der *Real-time*-PCR erfolgte in 96-Loch-Platten. Im Anschluss an das Pipettieren der Proben wurde die Platte für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert, um die Ansätze im Gefäßboden zu sammeln. Um Verdunstung zu vermeiden, wurde die Platte durch einen durchsichtigen Film versiegelt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem iCycler iQ5 der Firma Biorad. Die Aktivierung der Polymerase wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min ermöglicht. Die Primer-Anlagerung sowie die Extension liefen in einem Schritt bei 60 °C ab. Im Anschluss an die Extension erfolgte jeweils eine Fluoreszenzmessung mit Hilfe des eingebauten optischen Moduls. Es erfolgten standardmäßig 40 Amplifizierungszyklen. Die Auswertung wurde mit dem Programm iQ5 2.0 Standard Edition der Firma Biorad durchgeführt.

1x	95 °C, 10 min	Aktivierung der Polymerase
----	---------------	----------------------------

40x	95 °C, 15 s	Denaturierung der Doppelstrang-DNA
	60 °C, 60 s	Primer-Anlagerung und Extension, anschließend Fluoreszenzmessung

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation und Kultur von primären humanen Lymphozyten

Primäre humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) wurden aus sogenannten *Buffy-Coats* (Leukozytenfilme, englisch *buff*: gelbbraun, *coat*: Film) gesunder Spender isoliert, welche vom Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn bereitgestellt wurden. *Buffy-Coats* sind angereicherte Leukozytenfraktionen, die bei der Verarbeitung von Vollblutspenden zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten für Transfusionszwecke als Nebenprodukt entstehen. Die Isolation von PBMCs aus *Buffy-Coats* erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation. Zu diesem Zweck wurden 15 ml Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer), welches eine Dichte von 1,077 g/ml hat, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurde das Ficoll vorsichtig mit 35 ml des *Buffy-Coats* (versetzt mit circa 30 % (v/v) PBS/2 mM EDTA) überschichtet und für 30 min bei 800 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Da Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte als Ficoll besitzen befinden sich diese Zelltypen am Ende der Zentrifugation als Pellet am Boden des Falcon-Röhrchens. Im Gegensatz dazu sind PBMCs sowie Thrombozyten geringerer Dichte als Ficoll und wandern daher nicht in die Ficoll-Phase ein. Die PBMCs, welche im Anschluss an die Zentrifugation eine sichtbare weißgelbe Schicht auf der Ficoll-Phase bilden, wurden abgenommen, in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zwei weitere Male in 50 ml PBS/2 mM EDTA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt (Abschnitt 2.3.3) und in PBS/2 mM EDTA versetzt mit 0,5 % (v/v) FBS resuspendiert.

Spezifische Zellpopulationen wurden anschließend mit Hilfe der MACS-Technologie (*Magnetic Activated Cell Sorting*) isoliert. Diese Technik dient der Abtrennung von bestimmten Zelltypen aus einem Gemisch verschiedener Zellen und basiert auf den unterschiedlichen und Zelltyp-abhängigen Expressionsmustern bestimmter Oberflächenmoleküle. Sogenannte *Microbeads*, etwa 50 nm große magnetische Partikel, welche mit verschiedenen Kombinationen an spezifischen Antikörpern gekoppelt sind, binden je nach Oberflächenexpression der Moleküle von Interesse an bestimmte Zellpopulationen und ermöglichen

so deren magnetische Auftrennung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die MACS-Separation mit Hilfe eines AutoMACS Pro S/N 614 und, abhängig von gewünschtem Zelltyp und durchzuführendem Versuch, einem der folgenden Zell-Separations-Reagenzien (Miltenyi) durchgeführt: CD4 Microbeads (130-045-101), CD4⁺ T cell Isolation Kit (130-096-533), CD8⁺ T cell Isolation Kit (130-096-495), NK cell Isolation Kit (130-092-657), CD19 Microbeads (130-050-301). Die Separation wurde nach den jeweiligen Angaben des Herstellers durchgeführt und resultierten in einem Reinheitsgrad von 90-95 %.

Die so erhaltenen aufgereinigten Zellen wurden mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ /ml in VLE-RPMI 1640⁺ resuspendiert und für bis zu vier Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Suspension in Zellkulturflaschen kultiviert. Falls eine Positiv-Selektion durchgeführt worden war, wurden die Zellen mindestens 48 h ruhen gelassen bevor funktionale Analysen durchgeführt wurden. Für den Fall, dass aus ruhenden CD4⁺ T Zellen *in vitro* Effektor T-Zellen generiert werden sollten, wurden *Dynabeads* gekoppelt mit aktivierenden α -CD3/CD28-Antikörpern (OKT3, CD28.05) in einem 1:1-Verhältnis zu den Zellen zugegeben und diese für 72 h inkubiert.

Buffy-Coats gesunder Spender wurden nach schriftlicher Genehmigung und in Abstimmung mit der Ethik-Kommission der Universität Bonn (lokaler Ethik-Beschluss 203/09) sowie nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki zur Verfügung gestellt und verwendet.

2.3.2 Kultur der T-Zelllinie Jurkat E6.1

Jurkat E6.1 T-Zellen sind humane leukämische T-Zell-Lymphoblasten welche aus der Jurkat FHCRC-Zelllinie durch Inkubation bei 41 °C für 48 h gewonnen wurden. Die ursprüngliche Jurkat Zelllinie (auch JM genannt) wurde in den 1970er Jahren aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Patienten mit akuter Leukämie isoliert und anschließend als *in vitro* Modellsystem für humane T-Zellen etabliert [144]. Die in dieser Arbeit verwendeten Jurkat E6.1 T-Zellen wurden bei ATCC erworben (TIB-152) und in RPMI 1640⁺ Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage auf einen Titer von 2×10^5 /ml gesplittet und nicht über Passage 40 hinaus verwendet. Die langfristige Lagerung erfolgte in RPMI 1640⁺ Medium versetzt mit weiteren 10 % FBS sowie 10 % DMSO in 1 ml Aliquots mit einem Zelltiter von 5×10^6 /ml in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Hämozytometer (Neubauer Zählkammer). Falls nötig, wurde die Zellsuspension mit PBS oder Trypanblau mit einem bestimmten Verdün-

nungsfaktor (Vf) verdünnt. Anschließend erfolgte die Zählung und Addition der Zellen in 4 Großquadraten mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops. Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (Mw) pro Großquadrat bestimmt und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Kammerkonstanten ($1 \times 10^4/\text{ml}$) anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = Mw * Vf * \left(\frac{1 * 10^4}{\text{ml}} \right)$$

2.3.4 Elektroporation primärer humaner CD4⁺ T-Zellen mit siRNA oder Vektor-DNA

Die Transfektion von T-Zellen mit Vektor-DNA oder siRNA erfolgte mittels Elektroporation, einer physikalischen Methode, welche dem Einbringen von DNA, RNA oder anderen Makromolekülen in lebende Zellen dient [154]. Diese Technik beruht auf der Tatsache, dass die Permeabilität von Biomembranen vorübergehend durch starke elektrische Impulse erhöht werden kann, ohne Membranstrukturen auf Dauer zu schädigen oder zu zerstören [155]. Durch die kurzfristig erhöhte Durchlässigkeit kann ein Austausch von Stoffen erfolgen, der in diesem Fall der Aufnahme von Vektor-DNA-Konstrukten oder siRNA-Molekülen diene, um entweder gezielt spezifische Fusionsproteine in den Zellen überzuexprimieren oder die Expression von endogenen Proteinen durch das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi), also durch den gezielten Abbau kodierender mRNAs, herunterzuregulieren [156].

Da sich Primärzellen oft sehr schwierig transfizieren lassen, wurde für die Transfektion von primären humanen CD4⁺ T-Zellen ein speziell auf diese Zellen zugeschnittenes Elektroporations-Verfahren angewendet. Hierzu wurde das *Amaza Nucleofector I* (Lonza) System sowie das *Amaza Human T Cell Nucleofector Kit* für unstimulierte Zellen (#VPA-1002, Lonza) verwendet. Das vorgegebene Protokoll des Herstellers wurde genaustens befolgt. Primäre humane CD4⁺ T-Zellen wurden sofort im Anschluss an ihre Isolation und Aufreinigung transfiziert. Bis zu 1×10^7 T-Zellen wurden in 100 µl einer frisch angesetzten Mischung aus *Nucleofector*-Lösung und -Zusatz (Mischverhältnis 4,5:1) aufgenommen. Anschließend wurden entweder 5 µg Vektor-DNA oder 300 nM siRNA zu der Zellsuspension hinzugegeben. Bei der Durchführung dieses Protokolls wurde stets mit Filterspitzen gearbeitet, um die Gefahr einer Kontamination mit RNAsen zu minimieren. Die 100 µl Zellsuspension wurde nun vorsichtig in eine sterile Elektroporationskuvette überführt und unter Verwendung des *Nucleofector*-Programms V24 elektroporiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in Zellkulturflaschen in VLE-RPMI 1640 versetzt mit 10% (vol/vol) FBS, jedoch ohne Antibiotika, für 24 h (Transfektion mit Vektor-DNA) oder 48 h (Transfektion mit siRNA) kultiviert und danach für Versuche

eingesetzt. Für den Fall einer Elektroporation mit siRNA wurde stets Renilla-Luciferase-siRNA als Kontrolle verwendet, da deren Sequenz keine nachweisbaren Homologien zum humanen Genom aufweist.

2.3.5 Elektroporation von Jurkat E6.1 T-Zellen mit Vektor-DNA

Für die Transfektion von Jurkat E6.1 T-Zellen mit Vektor-DNA wurden diese 24 h zuvor auf einen Titer von 2×10^5 /ml gesplittet und vor der Elektroporation einmal mit PBS gewaschen. Pro Elektroporations-Ansatz wurden 1×10^7 Zellen in 500 μ l vorgewärmtem RPMI 1640 versetzt mit 50 % (vol/vol) FBS aufgenommen. Das entsprechende Vektor-DNA-Konstrukt (je nach Konstrukt oder Anzahl der Konstrukte 10-30 μ g DNA pro Ansatz) wurde zugegeben und das Gemisch resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt.

Für die Elektroporation wurde das *Gene-Pulser-Xcell*-System von BioRad verwendet, das zusätzlich mit einem CE-Modul sowie einem *Shock-Pod* ausgestattet war. Die Zellen wurden unter folgenden Einstellungen an diesem Gerät elektroporiert:

Programm	Volt	Kapazität	Widerstand	Küvette
<i>Exponential</i>	240	1500 μ F	∞	4 mm

Im Anschluss wurden die Zellen in 15 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS aber ohne Antibiotikum aufgenommen und für weitere 24 h im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Daraufhin konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

2.3.6 Chemische Inhibition verschiedener Enzyme oder zellbiologischer Prozesse in Lymphozyten

Humane primäre Lymphozyten oder Jurkat E6.1 T-Zellen wurden mit verschiedenen chemischen Inhibitoren oder Toxinen versetzt, um unterschiedliche zelluläre Prozesse oder Enzyme zu inhibieren. Die Bezugsquellen der jeweiligen Biochemikalien sind in Abschnitt 2.1.3 aufgeführt. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: Chlorpromazin sowie Monodansylcadaverin für die Inhibition der Endozytose, Brefeldin A sowie Exo1 für die Inhibition von intrazellulärem Vesikeltransport und/oder Exozytose und Latrunculin A sowie Cytochalasin D für die Inhibition der F-Aktin-Polymerisierung. Zudem wurden zwei chemisch nicht miteinander verwandte Inhibitoren der Dynamin2 GTPase-Aktivität verwendet (Dynasore und Dynole 34-2), um beobachtete Effekte besser einordnen zu können und das Risiko von unspezifischen Effekten zu minimieren ([157], Abbildung 2.1).

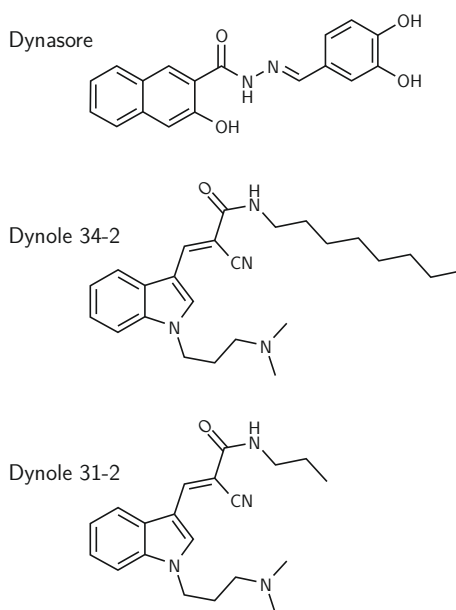


Abbildung 2.1: **Strukturformeln der beiden Dynamamin-Inhibitoren Dynasore und Dynole 34-2 sowie des inaktiven Kontroll-Moleküls Dynole 31-2.** Abbildung erstellt nach Robertson *et al.*, 2014 [157].

Mit Ausnahme von Brefeldin A und Chlorpromazin, welche in Ethanol beziehungsweise Wasser gelöst wurden, wurden alle Stammlösungen mit DMSO erstellt. Die Zellen wurden, falls nicht anderweitig angegeben, bei 37 °C und 5 % CO₂ zusammen mit den entsprechenden Inhibitoren in HBSS für 60 min (Cytochalasin D und Latrunculin A) oder 100 min (alle anderen Inhibitoren) vorinkubiert. Die Inhibitoren blieben zudem über den Zeitraum der Versuche anwesend.

2.3.7 Immunfluoreszenzmarkierung an adhärennten Jurkat E6.1 T-Zellen

Die mikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen während der Adhäsion und Aktivierung von T-Lymphozyten wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Markierungen an fixierten Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Mikrokanäle (μ -Slide VI^{0.4}, Ibidi) mit aktivierenden α -CD3 (10 μ g/ml) und α -CD28 (20 μ g/ml) Antikörpern sowie rekombinantem humanem ICAM-1-Fc beschichtet (Abschnitt 2.4.1). Jurkat E6.1 T-Zellen (teilweise transfiziert mit Vektor-DNA-Konstrukten, Abschnitt 2.3.5) wurden einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und in HBSS resuspendiert. 1×10^5 Zellen wurden in einen Mikrokanal gegeben und, je nachdem welcher Zeitpunkt analysiert werden sollte, zwischen 15 min und 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das HBSS vorsichtig mit vorgewärmtem 4 % (m/v) PFA in HBSS ausgetauscht und für 20 min bei RT fixiert. Daraufhin wurde der Kanal dreimal mit HBSS gewaschen. Für die Färbung von zytoplasmatischen Proteinen mussten die Zellen nach der PFA-Fixierung zusätzlich

mit 0,2 % (v/v) Triton-X-100 in HBSS für 5 min permeabilisiert werden.

Die fixierten Zellen wurden danach für eine Stunde bei RT in 3 % (m/v) BSA/HBSS inkubiert, um unspezifische Bindestellen für Antikörper zu blockieren. Im Anschluss folgten die Inkubation mit einem spezifischen primären Antikörper (eine Stunde bei RT) in einer 0,3 % (m/v) BSA/HBSS-Lösung, ein dreimaliger Waschgang mit HBSS sowie die Inkubation mit einem entsprechenden fluorochromierten Sekundärantikörper (20 min bei RT), ebenfalls in einer 0,3 % (m/v) BSA/HBSS-Lösung. Wahlweise konnten den sekundären Antikörpern auch zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Markierung der DNA beziehungsweise des Zellkerns oder fluorochromiertes Phalloidin (10 μ M, Abschnitt 2.3.10) zur Markierung filamentösen Aktins (F-Aktin) zugegeben werden. Im Anschluss wurden die markierten Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und die Mikrokanäle sowie deren Reservoirs mit HBSS befüllt, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Schließlich konnten die fixierten Zellen unverzüglich mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM) analysiert werden.

2.3.8 Analyse von Proteindynamiken und -lokalisation an lebenden Jurkat E6.1 T-Zellen

Die mikroskopische Analyse von Proteindynamiken und -lokalisation während der T-Zell-Adhäsion und -Aktivierung wurde an lebenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Vektor-DNA-Konstrukten transfiziert (Abschnitt 2.3.5) und in Mikrokanäle ausgesät (Abschnitt 2.3.7). 15 min bis 4 h nachdem die Jurkat E6.1 T-Zellen in die Mikrokanäle transferiert worden waren (je nachdem welcher Zeitpunkt analysiert werden sollte) wurden diese mit Hilfe eines invertierten konfokalen Zeiss 5 Live LSMs, ausgestattet mit einem Plan-Fluar 100x/1.45 Öl-Immersions-Objektiv sowie einer Klimatisierungskammer (37 °C, 5 % CO₂), mikroskopiert. Hierfür wurde auf die basale Plasmamembran der Zellen fokussiert und diese mit einer Bildrate von 0,5 bis 2 Hz für eine gewünschte Dauer aufgenommen. Die erhaltene Bildsequenz konnte zudem für weitere Analysen, wie die Erstellung eines Kymographen, herangezogen werden. Hierfür wurde mit Hilfe des Programms ImageJ und des Plug-Ins *Line-Scan-Analysis* eine segmentierte Linie über die komplette Zelle gezogen. Von dieser Linie wurde mit Hilfe des Plug-Ins *Multiple Kymograph* eine kymographische Darstellung erzeugt, welche den Bereich der Linie über die Zeit aufträgt. Somit konnte eine räumlich-zeitliche Darstellung einzelner Proteinsignale erzeugt werden.

2.3.9 Analyse von Proteindynamiken an lebenden Jurkat E6.1 T-Zellen mittels FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)

Eine weitere Methode, um Proteindynamiken in lebenden Zellen mikroskopisch zu analysieren, ist die Methode *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP). Hierbei werden die zu analysierenden Moleküle mit Fluorophoren versehen (in diesem Fall das Protein Dynamin2 durch die Fusion an eGFP) und in bestimmten Arealen die Fluoreszenzintensität gemessen. In diesen Arealen wird die Fluoreszenz schließlich durch einen starken Laserimpuls irreversibel ausgebleicht und schließlich durch aus der Umgebung eindiffundierende Moleküle, die ebenfalls an das Fluorophor gekoppelt sind, wieder regeneriert. Von der Geschwindigkeit sowie dem maximalen Wert dieser Regeneration lassen sich dann Rückschlüsse auf die Diffusionsgeschwindigkeit sowie die Mobilität des Moleküls von Interesse ziehen.

Zunächst wurden Jurkat E6.1 T-Zellen und Mikrokanäle genauso vorbereitet wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben. Für die FRAP-Messungen wurde dann das konfokale Mikroskop Olympus Fluoview1000, ausgerüstet mit einem UPLANSAPO 60x/1.35 Objektiv sowie einer Inkubationskammer (37 °C und 5 % CO₂), verwendet. Die Messungen wurden in HBSS/10mMHEPES durchgeführt. Gesunde, transfizierte Zellen wurden ausgewählt und auf die basale Plasmamembran fokussiert. Für die Analysen wurde eine Pixelgröße von 207 nm, die 488 nm Laser-Linie auf 0,3 % Leistung sowie ein Bleichareal von 4,29 µm² eingestellt. Die Bildaufnahmen erfolgten mit 1 Hz für 120 s, wobei nach 3 s das Areal von Interesse mit der 405 nm Laser-Linie bei 100 % Leistung gebleicht wurde. Für die weitere Analyse wurde zudem auch die Fluoreszenz in zwei Kontrollregionen, einem Bereich innerhalb der Zelle, welcher gleiche Strukturen umfasste, sowie einem Hintergrund-Bereich außerhalb der Zelle, gemessen. Aufgrund auftretender Probleme wie Fokusdrift oder Ausbleichen der Proben während der Aufnahmen wurde eine Qualitätskontrolle für die Analyse eingeführt. Messungen wurden nur dann in die Auswertung mit einbezogen, wenn sich die mittlere Fluoreszenzintensität der letzten vier Werte im ungebleichten Kontrollareal der Zelle nicht um mehr als 15 % von der mittleren Fluoreszenzintensität der drei Anfangswerte unterschied. Für die weitere Analyse wurden die Daten in Microsoft Excel übertragen und dabei die jeweiligen Hintergrundwerte von den Messwerten abgezogen. Schließlich wurde die Fluoreszenzintensität für die jeweiligen Messzeitpunkte prozentual zum durchschnittlichen Ausgangswert bestimmt und graphisch dargestellt.

2.3.10 Markierung filamentösen Aktins in fixierten sowie lebenden Zellen

Die Markierung des F-Aktin-Zytoskeletts in fixierten Zellen erfolgte mit Hilfe von Phalloidin, dem Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Dieses Zellgift lagert sich

spezifisch an filamentöses Aktin an und stabilisiert es, so dass dessen physiologisch relevante Dynamik verhindert wird. Koppelt man diesen Stoff mit einem Fluorophor, kann man sich diese Eigenschaft zu Nutze machen und in fixierten Zellen F-Aktin-Strukturen gezielt für Fluoreszenz-basierte Analysetechniken sichtbar machen.

Um das F-Aktin-Zytoskelett mit Hilfe von Phalloidin in adhärenenten und fixierten Jurkat E6.1 T-Zellen zu markieren, wurde wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben verfahren. Die Permeabilisierung der Zellen durch 0,2 % (v/v) Triton-X-100 ist hierbei jedoch immer notwendig, um Phalloidin den Eintritt in die Zellen zu ermöglichen.

Zudem wurde das F-Aktin-Zytoskelett auch in primären CD4⁺ T-Zellen in Suspension markiert. Diese wurden mit 2 % (m/v) PFA/PBS für 10 min bei RT in Suspension fixiert. Um überschüssiges PFA abreagieren zu lassen, wurden die Ansätze mit 2 % (m/v) Glycin in PBS versetzt (Mischverhältnis 1:1) und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mittels eines Saponin-Puffers (PBS mit 0,1 % (m/v) Saponin und 0,5 % (m/v) BSA) für 10 min bei 4 °C permeabilisiert und anschließend Saponin-Puffer versetzt mit 20 µM fluorochromiertem Phalloidin in einem 1:1 Verhältnis zugegeben und die Zellen für 20 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Saponin-Puffer und einem abschließenden Waschschriff mit PBS konnten die primären CD4⁺ T-Zellen entweder mikroskopisch oder mittels Durchflussszytometrie analysiert werden.

Sollte jedoch die Dynamik F-Aktin-haltiger Strukturen in lebenden Zellen analysiert werden, konnte nicht mit Phalloidin gearbeitet werden. Zu diesem Zweck wurden Jurkat E6.1 T-Zellen mit einem Lifeact-eGFP-Konstrukt transfiziert und 24 Stunden später für Analysen mit einem *Laser-Scanning*-Mikroskop verwendet (Abschnitt 2.3.5). Lifeact, ein Peptid bestehend aus den ersten 17 Aminosäuren des aktinbindenden Proteins Abp140 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, bindet F-Aktin mit geringer Affinität, jedoch stetig wiederholt. Aus diesem Grund greift Lifeact nachweislich nicht in die Dynamik des F-Aktin-Zytoskeletts ein [135] und ist somit, fusioniert an ein fluoreszierendes Protein, gut geeignet für die Markierung und Analyse von F-Aktin-Strukturen in lebenden Zellen.

2.3.11 Analyse des Integrin-*Clusterings* auf primären CD4⁺ T-Zellen

Die Akkumulation von Integrin-Molekülen auf der Zelloberfläche, auch als Integrin-*Clustering* bezeichnet, ist eine Möglichkeit der Integrin-Aktivierung und wird als Valenzregulation bezeichnet. Ziel dieses Prozesses ist es, die Avidität der Integrin-Moleküle durch die Generierung multimerer Bindestellen in einem bestimmten Bereich der Zelle zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit wurde das *Clustering* von β_2 -Integrinen auf primären

humanen CD4⁺ T-Zellen anhand zweier unterschiedlicher Methoden analysiert.

Einerseits wurde das *Clustering* von β_2 -Integrinen auf ruhenden, unstimulierten CD4⁺ T-Zellen in Suspension untersucht, ohne dass Integrin-Liganden angeboten wurden. 24 h nach der Isolation und Aufreinigung (durch eine negativ-Selektion, so dass die T-Zellen unberührt blieben) wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in HBSS inkubiert. Anschließend wurde PFA so zugegeben, dass eine Lösung mit einer Endkonzentration von 2 % (m/v) PFA entstand. Die Zellen wurden dann für 10 min bei RT in Suspension fixiert. Um überschüssiges PFA abreagieren zu lassen, wurden die Ansätze mit 2 % (m/v) Glycin in HBSS versetzt (Mischverhältnis 1:1) und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift in HBSS wurden die Zellen mit einem primären monoklonalen Antikörper (MEM-48), welcher spezifisch für humanes CD18 (β_2 -Integrin) ist, und anschließend mit einem sekundären α -Maus-Cy3 Antikörper, jeweils gelöst in 0,3 % BSA/HBSS, für jeweils 20 min bei RT inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten mit den Antikörpern und im Anschluss daran wurde jeweils einmal mit HBSS gewaschen. Die markierten Lymphozyten wurden schließlich in Mikrokanäle (μ -Slide VI^{0,4}) ausgesät und nachdem sie sich abgesetzt hatten mit Hilfe eines invertierten konfokalen Zeiss 5 Live LSMs, ausgestattet mit einem Plan-Fluar 100x/1.45 Öl-Immersions-Objektiv, analysiert. Hierzu wurden Z-Stapel mit einem Intervall von 300 nm aufgenommen und zu einer Maximum-Intensitäts-Projektion zusammengesetzt. Anschließend wurde mit Hilfe des Programmes ImageJ ein Regenbogen-Filter über die Projektionen gelegt und der Anteil an Zellen mit Integrin-*Clustern* hoher Intensität (gekennzeichnet durch eine rot-Färbung) quantifiziert.

Des Weiteren wurde das *Clustering* von β_2 -Integrinen auf lebenden T-Zellen analysiert, wobei in diesem Fall Integrin-Liganden angeboten wurden. Primäre humane CD4⁺ T-Zellen, resuspendiert in HBSS, wurden in Mikrokanälen ausgesät, deren Oberfläche entweder nur mit humanem rekombinantem ICAM-1-Fc (Abschnitt 2.4.1) oder zusätzlich noch mit aktivierenden α -CD3- (OKT3, 2 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (CD28.05, 4 μ g/ml) beschichtet worden war. Zuvor wurde CD18 auf den T-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper MHM23, welcher keinen Einfluss auf die Integrin-Aktivität hat, in Kombination mit einem sekundären α -Maus-Cy3 Antikörper markiert (siehe oben, Markierung in diesem Fall jedoch an lebenden, nicht fixierten Zellen und bei 4 °C). Die T-Lymphozyten wurden zudem mit 1 μ M CFSE (Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester) gekennzeichnet, um diese für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Nachdem die Zellen in den Mikrokanälen ausgesät worden waren, wurden sie für 45 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines invertierten konfokalen Zeiss 5 Live LSMs, ausgestattet mit einem Plan-Fluar 100x/1.45 Öl-Immersions-Objektiv sowie einer Klimatisierungskammer (37 °C, 5 % CO₂), analysiert. Hierzu wurden Z-Stapel mit einem Intervall von 300 nm aufgenommen und

zu einer Maximum-Intensitäts-Projektion zusammengesetzt. Der gleiche Versuch wurde zudem mit dem aktivierenden α -CD18-Antikörper KIM185 durchgeführt, wobei die Zellen hierbei nur auf ICAM-1-Fc-beschichteten Oberflächen ausgesät und entweder ohne Zellmarkierung oder mit dem Farbstoff Fast DIO (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gekennzeichnet mikroskopiert wurden. Zudem wurden hierbei zusätzlich Z-Stapel über die Zeit aufgenommen (in diesem Fall mit einem Intervall von 1 μm), welche anschließend mit Hilfe des Programms ImageJ mit einem Regenbogen-Filter versehen wurden.

2.3.12 Quantifizierung der Chemokin-induzierten Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zellen

T-Zellen haben in unstimuliertem Zustand eine runde Morphologie. Werden die Lymphozyten jedoch mit einem Chemokin stimuliert, polarisieren sie sich. Dies bedeutet, dass sich ihre Morphologie verändert, was die Ausbildung eines Hinterendes mit einem Uropod sowie eines Vorderendes mit einem Leitsaum zu Folge hat. In der vorliegenden Arbeit wurde die Polarisierung von humanen T-Zellen auf zwei unterschiedliche Weisen analysiert.

Einerseits wurde die Morphologie von T-Zellen anhand eines Phasenkontrastmikroskops (Nikon Eclipse TE2000-E, Objektiv Plan Fluor 20x/0,45) bei 37 °C untersucht. Hierzu wurden 1×10^5 humane T-Zellen in HBSS aufgenommen und in Mikrokanäle gegeben. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CXCL12 uniform stimuliert. Nachdem die Zellen abgesunken waren, wurden mit Hilfe eines inversen Phasenkontrastmikroskops (Nikon Eclipse TE2000-E, Objektiv Plan Fluor 10x/0,3) Übersichtsaufnahmen gemacht und in ImageJ mit dem Zusatzmodul *Cell Counter* analysiert. Unterschieden wurde zwischen einer runden unpolarisierten und einer länglich polarisierten Morphologie und die Ergebnisse letztlich prozentual dargestellt. Pro Ansatz und Kondition wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt.

Des Weiteren wurde die Polarisierung der T-Zellen anhand des Oberflächenmoleküls CD44 bestimmt, welches im Rahmen der Polarisierung von Lymphozyten am Hinterende der Zelle, also im Uropod, akkumuliert. Hierfür wurden 1×10^5 humane T-Zellen in HBSS aufgenommen und, falls angegeben, mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CXCL12 stimuliert. 15 min nach der Stimulation wurden die Zellen mit vorgewärmtem 4 % (m/v) PFA/HBSS für 10 min bei RT fixiert, anschließend mit 2 % (m/v) Glycin/HBSS in einem 1:1-Mischverhältnis versetzt und für weitere 10 min bei RT inkubiert, um das PFA abreagieren zu lassen. Im Anschluss wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit einem α -CD44 Antikörper in 0,3 % (m/v) BSA/HBSS für 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde ein weiteres Mal mit HBSS gewaschen und die Zellen mit einem entsprechenden fluorochromierten

Sekundärantikörper, ebenfalls gelöst in 0,3 % BSA/HBSS, für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit HBSS wurden die Zellen in 30 μ l HBSS aufgenommen, in einen Mikrokanal (μ -Slide VI^{0.4}) pipettiert und nach dem Absetzen der Zellen mittels eines konfokalen Zeiss LSM 5 Live Mikroskops analysiert. Hierfür wurden Z-Stapel mit 0,3 μ m Intervall aufgenommen und zu einer Maximum-Intensitäts-Projektion überlagert.

2.3.13 Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie

Die Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (DIC) ist eine spezielle Methode der abbildenden Lichtmikroskopie, welche Unterschiede in der optischen Weglänge im Präparat von Interesse in Helligkeitsunterschiede des resultierenden Bildes umwandelt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode mit Hilfe eines konfokalen LSMs (Olympus Fluoview1000), ausgerüstet mit einem Plan Apochromat 60x/1.4 Öl-Immersions-Objektiv sowie einer Klimakammer (37 °C und 5 % CO₂), durchgeführt. Primäre humane CD4⁺ T-Zellen wurden in Mikroskopieschalen ausgesät, welche zuvor mit ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc beschichtet worden waren (Abschnitt 2.4.1), und für 45 min in den Schalen inkubiert. Falls angegeben, wurden die Zellen zudem mit 50 ng/ml PMA, 1 μ g/ml CXCL12 oder 5 μ g/ml KIM185 stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Schalen dreimal mit warmem HBSS gewaschen und anschließend mikroskopiert.

2.3.14 Durchflusszytometrie

Bei der Methodik der Durchflusszytometrie werden Zellen in einer Kapillare vereinzelt und mit einem Laser bestrahlt. Zuvor werden die Zellen häufig mit fluoreszenten, zellgängigen Stoffen oder auch mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern, welche gegen bestimmte Proteine (meist exprimiert auf der Zelloberfläche) gerichtet sind, markiert. Nachdem die Zellen mit dem Laser bestrahlt wurden, kann das abgelenkte Licht sowie die emittierte Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen detektiert und zu analytischen Zwecken herangezogen werden. Auf diese Weise sind genaue Aussagen über Granularität und Größe der analysierten Zellen, über den Anteil fluoreszierender Zellen in einer Population sowie, anhand der Fluoreszenz-Intensität, über die relative Expressionsstärke des analysierten Proteins oder Moleküls von Interesse möglich.

Antikörper-Markierungen wurden stets bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt, um eine mögliche Endozytose der Antikörper durch die Zellen zu vermeiden. Pro Probe wurden 1x10⁵ Lymphozyten in ein FACS-Röhrchen überführt und einmal mit PBS gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min, 4 °C, 300 x g) wurde das Pellet in 50 μ l PBS versetzt mit 1 % (m/v) BSA und dem entsprechenden Antikörper aufgenommen. Die Zellen

wurden anschließend für 15 min bei 4 °C inkubiert. Für den Fall, dass nicht direkt fluorochromierte primäre Antikörper verwendet wurden, musste dieser Schritt mit einem entsprechenden fluorochromierten Sekundärantikörper wiederholt werden. Nach einem Waschschrift in 1 ml PBS wurden die markierten Zellen in 150 µl PBS resuspendiert und in einem Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD) analysiert. Es wurden mindestens 20.000 Ereignisse pro Probe gemessen.

Eine Ausnahme bei diesem Protokoll bildeten Reporter-Antikörper für konformationsabhängige Integrin-Epitope (KIM127, mAb24, 327C und HUTS4), welche den Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte für 30 min (nach Stimulation) zugegeben wurden. Die Immunmarkierung mit dem entsprechenden fluorochromierten sekundären Antikörper wurde anschließend jedoch wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4 Funktionale Analysen

2.4.1 Adhäsions-Analyse humaner Lymphozyten unter statischen Bedingungen

Um die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner Lymphozyten zu analysieren, wurden *in vitro*-Adhäsionstests auf 2-dimensionalen Oberflächen, beschichtet mit immobilisiertem ICAM-1-Fc, VCAM-1-Fc oder Fibronectin, durchgeführt.

Verwendet wurden in diesem Versuch Petrischalen mit einem Durchmesser von 3 cm. Der zu beschichtende Bereich mit einer Fläche von circa 1 cm² wurde auf der Unterseite der Schalen mittig markiert. Die Fibronectin-Beschichtung erfolgte mit einer Lösung von 50 µg/ml humanem Fibronectin in PBS. 200 µl dieser Lösung wurden in den markierten Bereich pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit vorgewärmtem HBSS (37 °C). Um Schalen mit rekombinantem ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc zu beschichten, musste zuvor ein α -human-IgG-Fc γ Antikörper auf die entsprechend markierten Bereiche der Schalen aufgebracht werden. Dieser Antikörper bindet in leicht basischem Milieu durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Plastik der Petrischale. Zudem ist er spezifisch für den Fc-Teil der Fusionsproteine und immobilisiert diese somit in der richtigen Orientierung auf dem Plastik, was zu einer Anreicherung von ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc auf dessen Oberfläche führt. Dazu wurden 200 µl eines Ziege- α -human-IgG-Fc γ Antikörpers (1:100 in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5)) auf den zu beschichtenden Bereich aufgebracht. Nach 90 min Inkubationszeit bei RT wurden die Schalen dreimal mit Tris/HCl gewaschen und anschließend bei 4 °C über Nacht mit 2 ml einer 1 % (m/v) BSA/PBS-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachdem die Blockierlösung abgenommen worden war wurden 500 µl eines

Zellüberstandes zugegeben, welcher das entsprechende humane rekombinante Fusionsprotein (ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc) enthielt. Diese Fusionsproteine bestehen aus den extrazellulären Domänen von humanem ICAM-1 oder VCAM-1 und einem C-terminalen Fc-Teil, zusammengesetzt aus der CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG₁. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die Schalen dreimal mit vorgewärmtem HBSS gewaschen.

Schließlich wurden, je nach Experiment, verschiedene humane Lymphozyten-Typen mit einer Zelldichte von 2×10^6 /ml in warmem HBSS aufgenommen und je 1 ml auf eine Schale gegeben. Zudem konnte, falls angegeben, die Lymphozyten-Adhäsion durch Zugabe von 50 ng/ml PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), 1 µg/ml CXCL12, 5 µg/ml KIM185 oder *Dynabeads* beschichtet mit aktivierenden α -CD3/CD28 Antikörpern (1:1-Verhältnis zu den Zellen) stimuliert werden. Die Adhäsion der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 45 min bei 37 °C im Inkubator. Im Anschluss wurden die Schalen dreimal mit warmem HBSS gewaschen, so dass idealerweise keine adhärenen Zellen mehr ausserhalb des beschichteten Bereiches zu finden waren. Daraufhin wurden die adhärenen Zellen mit 4 % (v/v) PFA in HBSS fixiert und in einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E, Objektiv Plan Fluor 10x/0,3) analysiert. Die Auszählung der adhärenen Zellen pro mm² erfolgte anschließend manuell mittels ImageJ und dem Zusatzmodul *Cell Counter*.

2.4.2 Adhäsions-Analyse humaner CD4⁺ T-Zellen unter unidirektionaler laminarer Strömung

T-Lymphozyten müssen *in vivo* häufig an Stellen adhäreren, an denen laminare Strömung auf sie einwirkt (beispielsweise innerhalb von Blutgefäßen während der Extravasation). Um diesem physiologischen Prozess im Labor möglichst nahe zu kommen, wurde durch das Anwenden von Techniken der Mikrofluidik das Adhäsionsverhalten von T-Zellen unter Strömungsbedingungen *in vitro* analysiert.

Zu diesem Zweck wurden Mikrokanäle (je nach Versuch entweder ein µ-Slide VI^{0.4} oder Mikrokanäle der µ-slide I Luer Familie) mit den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc beschichtet (Abschnitt 2.4.1). Die Kanäle wurden im Anschluss an die Beschichtung mit HBSS befüllt und für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Falls kleine Gasblasen innerhalb der Kanäle entstanden wurden diese durch leichtes Aufklopfen der Kanäle auf den Untergrund beseitigt. Bevor die Kanäle dann für die Experimente verwendet werden konnten, wurden diese für 15 min bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit mit 1 µg/ml CXCL12 beschichtet.

Die unidirektionale laminare Strömung wurde mit Hilfe von Spritzen-Pumpsystemen

(AL1000 Aladdin) generiert. Die kontrollierte Flussgeschwindigkeit wurde so eingestellt, dass die resultierende Scherkraft an der mit Integrin-Liganden beschichteten Oberfläche innerhalb des Kanals je nach Versuch entweder 1 dyn/cm^2 oder $2,8 \text{ dyn/cm}^2$ betrug. Schließlich wurde eine Zellsuspension (5×10^5 bis 2×10^6 /ml in HBSS versetzt mit 10 mM HEPES) in ein Falcon-Röhrchen gefüllt und dieses mit Hilfe eines Silikonschlauchs (Durchmesser $0,8 \text{ mm}$) und speziellen Luer-Konnektoren mit dem Mikrokanal luftblasenfrei verbunden. Der Ausgang des Mikrokanals wurde dann ebenfalls über Konnektoren der Luer-Familie und einen Silikonschlauch mit einer Spritze verbunden, welche dann auf dem Spritzen-Pumpsystem montiert wurde. Dieses wurde im Anschluss gestartet, was dazu führte, dass die Zellsuspension durch die Schläuche und den Mikrokanal in die Pumpe gezogen und somit die Zellen den Integrin-Liganden unter unidirektionaler laminarer Strömung ausgesetzt wurden. Die Lymphozyten wurden im Folgenden für 30 min bei 37°C in einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E, Objektiv Plan Fluor $20\times/0,45$) analysiert indem alle 20 s ein Bild aufgenommen wurde. Nach 30 min wurde dann für 2 min mit vorgewärmtem HBSS (versetzt mit 10 mM HEPES) bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit gewaschen, um nicht adhären Zellen zu beseitigen. Im Anschluss wurde ein Bild aufgenommen und eine Endpunktanalyse durchgeführt. Die Anzahl adhären Zellen pro mm^2 wurde in ImageJ manuell mit dem Zusatzmodul *Cell Counter* bestimmt. Zudem konnte die erhaltene Bildsequenz in ImageJ mit den Zusatzmodulen *Manual Tracking* und *Chemotaxis Tool* analysiert und bildlich dargestellt werden.

2.4.3 Analyse der Migration von CD4^+ T-Zellen mittels einer modifizierten *Transwell*-Boyden-Kammer

Mit diesem Versuch wurde die Chemotaxis humaner CD4^+ T-Zellen durch eine poröse Membran analysiert.

Der Versuch wurde unter Verwendung von modifizierten *Transwell*-Boyden-Kammern durchgeführt ([158], Costar, Corning). Diese Kammern sind aus zwei Kompartimenten aufgebaut, welche nur durch eine Membran aus Polycarbonat getrennt sind. Die einzige Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten besteht aus $3 \mu\text{m}$ großen Poren innerhalb dieser Membran.

Pro Ansatz wurden 5×10^5 humane CD4^+ T-Zellen in VLE-RPMI 1640 Hungermedium⁺ ($100 \mu\text{l}$) aufgenommen und in das obere Kompartiment überführt, welches einen Durchmesser von $6,5 \text{ mm}$ hatte. Das untere Kompartiment wurde ebenfalls mit VLE-RPMI 1640 Hungermedium⁺ ($600 \mu\text{l}$) befüllt, jedoch versetzt mit 200 ng/ml CXCL12.

Für jeden zu analysierenden Ansatz wurden mindestens zwei technische Replikate gefer-

tigt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, denen kein Chemokin zugegeben wurde. Die Kammern mit den Zellen wurden schließlich für 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die oberen Kompartimente entfernt und die transmigrierten Zellen, welche sich nun im unteren Kompartiment befanden, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Migrationsrate wurde anschließend prozentual zur jeweils eingesetzten Zellzahl angegeben.

2.4.4 Analyse der Migration humaner CD4⁺ T-Zellen auf 2-dimensionalen Integrin-Liganden

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit humaner CD4⁺ T-Zellen untersucht, auf einer mit Integrin-Liganden beschichteten 2-dimensionalen Oberfläche zu migrieren.

Zu diesem Zweck wurden Mikrokanäle (μ -Slide VI^{0.4}) mit ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc beschichtet (Abschnitt 2.4.1). Nach erfolgter Beschichtung wurden die Mikrokanäle mit HBSS befüllt und anschließend für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator äquilibriert. Anschließend wurden 1x10⁵ humane CD4⁺ T-Zellen in 30 μ l HBSS aufgenommen und in die entsprechenden Mikrokanäle pipettiert. Falls angegeben, wurde die Chemokinese der Zellen mit einer uniformen Zugabe von 1 μ g/ml CXCL12 stimuliert. Die Lymphozyten wurden anschließend mit einem Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E) bei 37 °C analysiert. Mit einem Plan Fluor 20x/0,45 Objektiv wurde für einen Zeitraum von 30 min alle 15 s ein Bild aufgenommen. Die so erhaltene Bildsequenz wurde mit Hilfe von ImageJ und den Zusatzmodulen *Manual Tracking* und *Chemotaxis Tool* ausgewertet.

2.4.5 Analyse der Migration humaner CD4⁺ T-Zellen in 3-dimensionalen Kollagen-Gelen

Um die Migration von Lymphozyten durch interstitielle Gewebe, wie sie *in vivo* häufig vorkommt, besser *in vitro* simulieren zu können, wurden T-Zellen in einem 3-dimensionalen Kollagen-Gel eingebettet und ihre Migration innerhalb dieser räumlich beengenden Umgebung analysiert.

Die Fertigung des Kollagen-Zell-Gemisches wurde ähnlich wie bereits beschrieben durchgeführt [159]. 50 μ l NaHCO₃ (7,5 %), 100 μ l 10xHBSS sowie 750 μ l Kollagen I wurden vorsichtig auf Eis zusammenpipettiert. Anschließend wurden für die einzelnen Ansätze 200 μ l des Kollagen-Gemisches mit 100 μ l einer Zellsuspension (insgesamt 2x10⁶ humane CD4⁺ T-Zellen in HBSS) behutsam vermischt und in Immunfluoreszenzkammern (μ -Slide 8-Loch) überführt. Die Polymerisation des Gels erfolgte nun für 60 min bei 37 °C im Inkubator. Nachdem es auspolymerisiert war, wurden auf das Kollagen-Gel 200 μ l HBSS

pipettiert, so dass das komplette Gel mit Puffer bedeckt und vor Austrocknung geschützt war. Falls angegeben, wurde dem Kollagen-Zell-Gemisch sowie dem überdeckenden Puffer der Inhibitor Dynasore uniform zugegeben, was die Inhibition der GTPase-Aktivität von Dynamin2 zur Folge hatte. Zudem konnte mit der uniformen Zugabe des Chemokins CXCL12 (1 µg/ml) in Kollagen-Gel und HBSS eine ungerichtete Chemokinese der Zellen stimuliert werden.

Die optische Analyse der Migration der im Kollagen-Gel eingebetteten Zellen erfolgte in einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E, Objektiv Plan Fluor 20x/0,45) bei 37 °C für 30 min. Alle 20 s wurde ein Bild aufgenommen und die erhaltene Bildserie mit ImageJ und den Zusatzmodulen *Manual Tracking* sowie *Chemotaxis Tool* ausgewertet.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die zu untersuchenden Zellen wurden, falls sie zuvor noch in FBS-haltigem Medium und nicht schon in Puffer resuspendiert waren, einmal in kaltem HBSS gewaschen und das Pellet nach einer Zentrifugation (5 min bei 4 °C und 300 x g) vorsichtig in Igepal-Lysepuffer resuspendiert. Der Igepal-Lysepuffer wurde zuvor noch mit den Proteaseinhibitoren Benzamidin (1 mM), Antipain (2 µg/ml), PMSF (0,1 mM), Aprotinin (10 µg/ml) und Leupeptin (10 µg/ml) versetzt. Die Zellen wurden anschließend für 15 min auf Eis lysiert. Für den Fall, dass Proteine in phosphoryliertem Zustand analysiert werden sollten, wurde anstelle von Igepal-Lysepuffer MRC-Lysepuffer verwendet, welcher Phosphatase-Inhibitoren beinhaltet und ebenfalls frisch mit Proteaseinhibitoren versetzt wurde. Im Anschluss an die Zelllyse wurden die Proben bei 16.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile der Zellen wie Kerne und Membranen zu pelletieren. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, welcher die gelösten Proteine enthielt, in ein neues Polypropylen-Reaktionsgefäß überführt.

Da bei den folgenden Analysen verschiedene Proben direkt miteinander verglichen werden sollten, musste im Anschluss an die Zelllyse eine Messung der Proteinkonzentration des Lysats durchgeführt werden. Dies erfolgte mittels eines BCA-Tests [160]. Diese Methode beruht auf der als Biuretreaktion bekannten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch die Aminosäurereste von Cystein, Tyrosin sowie Tryptophan. Die im BCA-Reagenz enthaltene Bicinchoninsäure bildet mit Cu^{+} daraufhin einen farbigen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde

an mindestens zwei technischen Replikaten durchgeführt. Je 3 µl der zu testenden Proteinlösung wurden mit 200 µl frisch hergestelltem BCA-Reagenz gemischt und in einer 96-Loch-Platte für 10 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 562 nm mit einem Multi-Detektions-Plattenlesegerät gemessen. Durch einen Vergleich des gemittelten Messwertes mit einer Eichkurve aus Lösungen bekannter Konzentrationen eines BSA-Proteinstandards, welche ebenfalls auf die 96-Loch-Platte aufgetragen worden waren, wurde die Gesamtproteinkonzentration schließlich berechnet.

Im Anschluss wurden die Zelllysate entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Igepal-Lysepuffer	MRC-Lysepuffer
10 mM HEPES pH 7,5	50 mM Tris-HCl
10 mM KCl	1mMEGTA
10 mM MgCl ₂	1 mM EDTA
150 mM NaCl	10 mM β-Glycerolphosphat
1 % Igepal	50 mM NaF
	5 mM Natriumdiphosphat
	1 mM Natriumvanadat
	270 mM Saccharose
	1 % Triton

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Unterschiedliche Proteine haben sehr unterschiedliche Ladungen, da sie aus verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt sind. Diese Ladungen müssen daher nivelliert werden, wenn die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden sollen. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) geschieht dies durch Zugabe des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Probenpuffer. Dieser lagert sich an die Proteine an, maskiert deren Eigenladung und sorgt für eine konstante, stark negative Gesamtladung des Proteins, welche sich proportional zu dessen Masse verhält. Die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS/Protein-Komplexe im elektrischen Feld ist somit abhängig von ihrem Molekulargewicht. Zudem denaturiert SDS die Proteine, indem es hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinuntereinheiten aufhebt. Da Disulfidbrücken durch SDS nicht gelöst werden, enthält der Probenpuffer zusätzlich das reduzierende Thiol Dithiotreitol (DTT), welches diese durch Reduktion spaltet.

In der vorliegenden Arbeit wurden, je nach Größe des Proteins von Interesse, SDS-Polyacrylamid-Trenngele mit Konzentrationen von 8 bis 12 % verwendet. Auf diese wurden Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 50 µg pro Zelllysate von Interesse geladen.

Für eine Optimierung der Bandenschärfe wurde mit einem diskontinuierlichem Puffersystem gearbeitet, bei welchem über das eigentliche Trenngel ein weiteres, zur Konzentrierung der Proteine gedachtes Sammelgel gegossen wurde [161]. Das Sammelgel besitzt eine geringere Polyacrylamidkonzentration als das Trenngel und einen niedrigeren pH-Wert. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine. Als Elektrolyt wurde ein SDS-haltiger Tris-Glycin-Puffer eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel. Um das Molekulargewicht der Proteine innerhalb des Gels abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Proteinstandard aufgetragen. Verwendet wurde hierfür der Proteinstandard *Precision All Blue* von BioRad. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme sowie der verschiedenen Polyacrylamidgele sind im Folgenden aufgelistet:

	Probenpuffer	Laufpuffer
	0,28 M Tris-HCl pH 8	25 mM Tris
	30 % Glycerol	200 mM Glycin
	10 % SDS	0,1 % SDS
	60 mM DTT	
	0,0012 % Bromphenol-Blau	

	Sammelgel 5 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
A. bidest	3,4 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml
Tris-HCl-Puffer ¹	0,63 ml	1,3 ml	1,3 ml	2,0 ml
30 % Acrylamid	0,83 ml	1,3 ml	1,7 ml	1,3 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,005 ml	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml

2.5.3 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine, welche sich nach dem Molekulargewicht aufgetrennt innerhalb des Polyacrylamid-Gels befanden, im Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [162]. Diese Methode dient der Immobilisierung der Proteine auf der Nitrozellulose und ermöglicht einen anschließenden spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen durch eine Immunmarkierung.

Die Nitrozellulosemembran, das Gel, 3 mm-Whatman-Filterpapiere sowie Schwämme wurden in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3 in 20 % (v/v) Methanol) getränkt. Auf einen Schwamm wurden 3 Filterpapiere, die Nitrozellulose, das Gel, weitere

¹Für die Trenngele wurde 1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 verwendet, für das Sammelgel 1,0 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8

3 Filterpapiere sowie ein weiterer Schwamm gelegt. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und der Aufbau wurde schließlich in eine Nassblot-Kammer eingesetzt, welche zuvor mit Transferpuffer gefüllt worden war. Der Transfer erfolgte bei 80 V für 120 min bei 4 °C. Die Proteine wandern dabei im elektrischen Feld Richtung Anode auf die Membran und werden dort immobilisiert.

2.5.4 Immunbiochemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

Auf den Western-Blot folgte eine Immunmarkierung der Proteine von Interesse auf der Nitrozellulosemembran. Hierfür wurde die Membran für 10 min in TBST (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend in einer Blockierlösung (5 % (m/v) Milchpulver oder BSA in TBST) für 1 h bei RT unter Bewegung inkubiert. Dies dient dem Blockieren unspezifischer Bindestellen des Antikörpers und minimiert somit das Hintergrundrauschen bei der Auswertung des Versuches. Antigen-spezifische primäre Antikörper wurden je nach verwendetem Typ in Verdünnungen zwischen 1:50 und 1:1000 in 5 % (m/v) Milchpulver/TBST beziehungsweise BSA/TBST eingesetzt und bei 4 °C unter ständiger Bewegung über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran mindestens dreimal für 10 min bei RT in TBST gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST für weitere 45 min bei RT auf den Blot gegeben. Sekundäre Antikörper erkennen den speziesspezifischen Teil der konstanten Region eines primären Antikörpers und waren in diesem Fall mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Es folgten drei weitere Waschschritte in TBST für jeweils 10 min bei RT. Schließlich wurde die markierte Membran für 1 min mit frisch angesetzter ECL-Lösung (verbesserte Chemilumineszenz) inkubiert. Der Peroxidase-gekoppelte Antikörper katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol (beides ist in der ECL-Lösung enthalten) und erzeugt somit Chemilumineszenz. Ein strahlungssensitiver Film wurde daraufhin auf die Membran aufgelegt. Der erhaltene Schwärzungsgrad gab schließlich Auskunft über die Anwesenheit sowie die relative Menge des untersuchten Proteins. Die Quantifizierung der relativen Proteinmengen erfolgte mit Hilfe der *Gel Analyzer* Funktion des Programms ImageJ.

2.5.5 Regeneration von Proteinblots

Nitrozellulosemembranen, mit denen bereits ein immunbiochemischer Nachweis eines bestimmten Proteins durchgeführt worden war, wurden teilweise für weitere Antikörperfärbungen verwendet. Dafür musste der zuvor gebundene Antikörper entfernt werden. Die spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper wurde mit Hilfe eines speziellen Puffers gelöst, welcher jedoch keinen Einfluss auf die Immobilisierung des Proteins selbst

an die Nitrozellulosemembran hat. In diesem so genannten *Stripping*-Puffer wurde die Nitrozellulosemembran für 15 min bei 150 °C erhitzt. Anschließend wurde die Membran bei RT für mindestens 2 h unter mehrfachem Wechsel von TBST gewaschen.

***Stripping*-Puffer**

A. bidest	73,75 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	6,25 ml
SDS 10 %	20 ml
β-Mercaptoethanol	0,8 ml

2.5.6 Biochemischer *Pulldown* aktivierter kleiner GTPasen

Kleine GTPasen befinden sich in einem aktiven Zustand wenn sie an GTP (Guanosintri-phosphat) gebunden sind, in inaktivem Zustand sind sie an GDP (Guanosindiphosphat) gebunden. Um die Aktivierung kleiner GTPasen zu analysieren, kann man sich dies zu Nutze machen, indem man Domänen von Effektor-Proteinen für einen biochemischen *Pulldown* verwendet, welche nur an die GTP-gebundene Form der GTPase binden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür kommerzielle Reaktionssysteme (Kits) verwendet und das entsprechende Protokoll des Herstellers (ThermoFisher Scientific) befolgt.

Humane CD4⁺ T-Zellen wurden in Suspension (HBSS) mit verschiedenen Stimuli aktiviert und nach der entsprechenden Inkubationsphase bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator abzentrifugiert (100 x g für 5 min bei 4 °C). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit dem im Kit enthaltenen Bindungs-/Wasch-/Lyse-Puffer (BWL-Puffer) für 5 min auf Eis lysiert. Der BWL-Puffer wurde zuvor noch mit den Proteaseinhibitoren Benzamidin (1 mM), Antipain (2 µg/ml), PMSF (0,1 mM), Aprotinin (10 µg/ml) und Leupetin (10 µg/ml) versetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle folgenden Schritte bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden bei 16.000 x g für 15 min abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Nun wurde ein BCA-Test durchgeführt, um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen (Abschnitt 2.5.1). Im Anschluss wurde für jede Probe eine bestimmte Menge an Zelllysate abgenommen (wenn möglich 20 µg), um diese später als *Input*-Kontrolle für die Western-Blot Analyse zu verwenden. Der Rest der Zelllysate wurde nun für den *Pulldown* aktivierter kleiner GTPasen eingesetzt, wobei die zu vergleichenden Proben im Gesamtprotein-Gehalt angeglichen wurden.

Für den *Pulldown* wurden zunächst 100 µl einer 50 % (m/v) Glutathion-Granulat Suspension in ein Zentrifugations-Siebchen pipettiert, abzentrifugiert und einmal mit BWL-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 20 µg der Fusionsproteine GST-RalGDS-RBD (bei einem Pulldown von Rap1 oder Ras) beziehungsweise GST-Pak1-PBD (bei einem

Pulldown von Rac1) auf das trockene Glutathion-Granulat pipettiert. GST (Glutathion-S-Transferase) bindet mit hoher Affinität an Glutathion, was zu einer Immobilisierung der entsprechenden Fusionsproteine sowie aller an diese gebundenen Proteine an dem Glutathion-Granulat führt. Im Anschluss konnten die Zelllysate zugegeben werden und nachdem die Proben mit einem Vortexer gemixt worden waren wurden sie für 1 h bei 4 °C sowie unter schonendem Rütteln inkubiert. Danach wurde das Zelllysate abzentrifugiert und das Glutathion-Granulat dreimal mit BWL-Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde schließlich bei RT durch Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer versetzt mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol von dem Glutathion-Granulat eluiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot analysiert (Abschnitte 2.5.2 und 2.5.3).

2.5.7 Co-Immunpräzipitation

Für die Analyse einer direkten Interaktion zwischen Proteinen wurde die Methodik der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) verwendet, welche darauf beruht, ein Protein von Interesse inklusive seiner Interaktionspartner mittels immobilisierter Antikörper aus einem Zelllysate zu depletieren.

Zu diesem Zweck wurden Protein G- oder Protein A-beschichtete magnetische Kügelchen (*Dynabeads*, 50 μ l einer Suspension) mit 2 μ g eines entsprechenden primären Antikörpers gegen das Protein von Interesse für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Als Negativkontrolle wurde stets ein vergleichbarer unspezifischer Isotyp verwendet. Protein G sowie A haben eine hohe Affinität für die Fc-Regionen von Immunglobulinen des Isotyps IgG und sind somit gut dafür geeignet Antikörper zu immobilisieren. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Antikörper wurden die Dynabeads dreimal mit Hilfe eines Magnetständers in IP-Puffer gewaschen, welcher zuvor mit den Proteaseinhibitoren Benzamidin (1 mM), Antipain (2 μ g/ml), PMSF (0,1 mM), Aprotinin (10 μ g/ml) und Leupetin (10 μ g/ml) versetzt worden war.

Humane CD4⁺ T-Zellen wurden in Suspension (HBSS) mit verschiedenen Stimuli aktiviert und nach der entsprechenden Inkubationsphase bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator abzentrifugiert (300 x g für 5 min bei 4 °C). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit IP-Puffer (versetzt mit Proteaseinhibitoren) für 15 min auf Eis lysiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle folgenden Schritte bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden bei 16.000 x g für 15 min abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Nun wurde ein BCA-Test durchgeführt um die Proteinkonzentration der Überstände zu bestimmen (Abschnitt 2.5.1). Im Anschluss wurde für jede Probe eine bestimmte Menge an Zelllysate abgenommen (wenn möglich 20 μ g), um diese später als *Input*-Kontrolle für die Western-Blot Analyse

zu verwenden. Der Rest der Zellysate wurde nun für die Co-IP mit den Antikörper-beschichteten *Dynabeads* eingesetzt, wobei gleiche Mengen für die jeweiligen Proben eingesetzt wurden.

Die Co-IP erfolgte dann für 4 h bei 4 °C auf einem Drehrad. Im Anschluss daran wurden die *Dynabeads* mit Hilfe eines Magnetständers fünfmal in IP-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol und anschließendem Aufkochen bei 95 °C für 7 min. Abschließend wurde die Co-IP mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert (Abschnitte 2.5.2 und 2.5.3).

IP-Puffer

10mM HEPES

2 mM MgCl₂

10 mM KCl

0,1 mM Triton X-100

0,5 mM EDTA

150 mM NaCl

2.6 Statistische Auswertung

Daten, die bei den Messungen erhoben wurden, sind meist als Mittelwert + Standardfehler (S.E.M.) oder +/- Standardabweichung (S.D.) von n unabhängigen Experimenten dargestellt (genaue Angaben befinden sich in den jeweiligen Abbildungslegenden). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism“ unter Verwendung des t-Tests für abhängige oder unabhängige Stichproben überprüft. Von einer statistischen Signifikanz wurde bei einem Wert von $P \leq 0,05$ ausgegangen.

3 Ergebnisse

3.1 Humane CD4⁺ T-Zellen als Modellsystem zur Analyse der Immunzelladhäsion

Das Immunsystem, ein dezentralisiertes Organ, ist in seiner Funktion stark abhängig von der koordinierten Dynamik seiner zellulären Hauptbestandteile, den Leukozyten. Um Infektionen überall im Körper effizient erkennen und diese schließlich in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten melden zu können, müssen Immunzellen eine hohe Mobilität aufweisen und schnell auf Stimuli reagieren, welche diese Dynamik beeinflussen. Während an manchen Punkten in dieser Kaskade eine persistente und gerichtete Migration notwendig ist, wie sie beispielsweise nach der Aktivierung von dendritischen Zellen in der Peripherie beobachtet werden kann, muss an anderen Stellen eine sofortige Immobilisierung der Immunzellen erreicht werden, zum Beispiel während der Extravasation von Leukozyten aus den Blutgefäßen. Dementsprechend muss das Zusammenspiel von zellulärer Motilität und Adhäsion in Leukozyten streng reguliert und zügig zu beeinflussen sein. Dies geschieht in Immunzellen vor allem über die Regulation von Adhäsionsrezeptoren der Integrin-Familie. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der großen GTPase Dynamin2 in diesem Regulationsprozess mit Hilfe von *in vitro*-Versuchen untersucht werden. Als Modellsystem wurden hierfür vorzugsweise primäre humane CD4⁺ T-Zellen im Ruhezustand verwendet. Diese Zellen eignen sich besonders gut für die Analyse von Integrin-vermittelter Zelladhäsion, da sie in ihrem Anhaftungsverhalten von der Bereitstellung externer Integrin-Liganden abhängig sind und nicht, wie viele andere Zelltypen, auf reinem Plastik adhärieren können (Abbildung 3.1 A). Zudem müssen die Integrine von T-Lymphozyten zuerst durch externe Stimuli aktiviert werden, um an ihre Liganden zu binden (Abbildung 3.1 B). Die Kombination dieser beiden Verhaltensmuster machen T-Lymphozyten zu einem perfekten Modellsystem zur Analyse Integrin-vermittelter Adhäsion, da spezifische Paarungen von Integrinen und ihren Liganden im Kontext spezieller Adhäsions-induzierender Stimuli untersucht werden können.

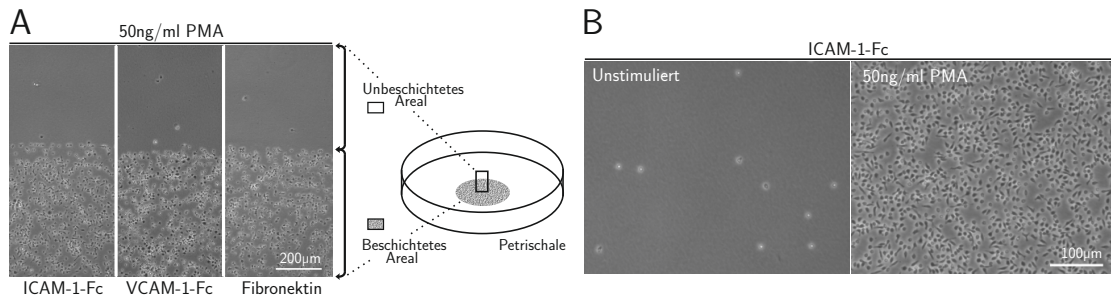


Abbildung 3.1: **Humane $CD4^+$ T-Zellen sind ein gutes Modellsystem zur Analyse von Integrin-vermittelter Adhäsion.** (A) Schema eines Versuchsaufbaus zur Analyse von Integrin-abhängiger Adhäsion unter statischen Bedingungen. Das Zentrum einer Petrischale wird mit einem Integrin-Liganden beschichtet während die Peripherie unbeschichtet bleibt. Die Phasenkontrast-Aufnahmen zeigen die Grenzfläche zwischen beschichteter und unbeschichteter Oberfläche mit PMA-stimulierten adhärenter $CD4^+$ humanen T-Zellen, welche in ihrer Adhäsion von der Präsenz von Integrin-Liganden abhängen und somit nur auf dem beschichteten Areal anhaften. (B) Phasenkontrast-Aufnahmen adhärenter $CD4^+$ T-Zellen auf ICAM-1-Fc. Die Zellen müssen stimuliert werden (in diesem Fall mit 50 ng/ml PMA) um an dem angebotenen Integrin-Liganden anzuhafte. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.2 Dynamin2-Expression und -Lokalisation in humanen $CD4^+$ T-Zellen

In Säugetieren werden drei unterschiedliche Isoformen von Dynamin exprimiert. Nah verwandte Protein-Isoformen können sich zum Teil in ihrer Funktion überschneiden. Da in der vorliegenden Arbeit die spezifische Rolle von Dynamin2 bei der Immunzelladhäsion untersucht werden sollte, wäre ein Modellsystem von Interesse, welches vorzugsweise nur Dynamin2 exprimiert. Dies würde das Risiko minimieren, dass eventuell auftretende Effekte in Dynamin2-defizienten Zellen durch andere Dynamin-Isoformen kompensiert werden könnten. Interessanterweise konnte mit Hilfe quantitativer *Real-time-PCR* gezeigt werden, dass in humanen primären $CD4^+$ T-Lymphozyten nur Dynamin2 exprimiert wird, während die Isoformen Dynamin1 und Dynamin3 nicht nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.2 A). Des Weiteren konnte mittels konfokaler *Laser-Scanning-Mikroskopie* (LSM) eine interessante Lokalisation von Dynamin2-eGFP, überexprimiert in der humanen $CD4^+$ T-Zelllinie Jurkat E6.1, beobachtet werden. Unmittelbar nach der Stimulation der Jurkat E6.1 T-Zellen durch aktivierende Antikörper und deren anschließender Adhäsion auf dem Integrin-Liganden ICAM-1-Fc reicherte sich Dynamin2-eGFP in *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran an, also dem Teil der Zelle, an dem die Adhäsion stattfindet und zu großen Teilen mechanisch reguliert wird (Abbildung 3.2 B). Eine solche Lokalisation könnte für eine Funktion des Proteins bei der Integrin-vermittelten Adhäsion von T-Lymphozyten sprechen.

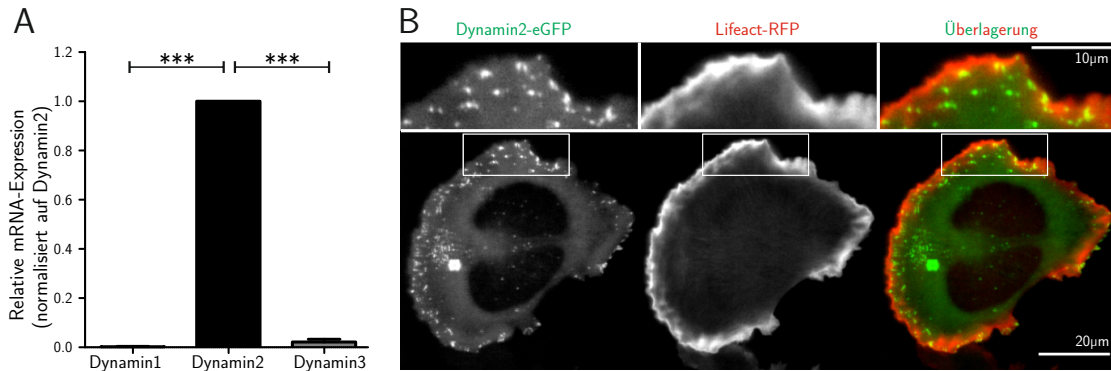


Abbildung 3.2: **Dynamin2 wird in humanen $CD4^+$ T-Zellen exprimiert und lokalisiert in adhärenen Zellen in *Clustern* an die basale Plasmamembran.** (A) Quantitative *Real-time*-PCR Analyse der mRNA-Expression von Dynamin1, Dynamin2 und Dynamin3 in primären humanen $CD4^+$ T-Lymphozyten im Ruhezustand. Mittelwert \pm S.E.M., $***P \leq 0,001$, $n = 5$. (B) Aufnahme einer Jurkat E6.1 T-Zelle, welche Dynamin2-eGFP sowie den F-Aktin-Marker Lifeact-RFP überexprimiert. Die Zelle wurde auf einer mit ICAM-1-Fc sowie α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) beschichteten Oberfläche ausgesät und für 15 min darauf inkubiert. Das Bild wurde mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop mit Fokus auf die basale Plasmamembran aufgenommen. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.3 Dynamin2 reguliert die statische Integrin-vermittelte Adhäsion humaner Lymphozyten

Um den Einfluss der großen GTPase Dynamin2 auf die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden zunächst Adhäsionsversuche unter statischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde der mittlere Bereich von Petrischalen mit einem Integrin-Liganden beschichtet und primäre humane $CD4^+$ T-Zellen für 45 min darauf inkubiert (Abbildung 3.1). Schließlich wurde die Anzahl adhärenter Lymphozyten pro mm^2 bestimmt. Die GTPase-Aktivität von Dynamin2 wurde durch die Zugabe des kleinen zellpermeablen Inhibitors Dynasore chemisch außer Kraft gesetzt [164], wobei die Kontrollzellen nur mit der entsprechenden Menge Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wurden, dem verwendeten Lösungsmittel für Dynasore. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, führte die chemische Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität durch Dynasore zu einer massiven Störung der Integrin-abhängigen Adhäsion von humanen $CD4^+$ T-Zellen. Dies wurde sowohl für die LFA-1-vermittelte (*Leukocyte Function-associated Antigen 1*) Adhäsion auf ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) als auch für die VLA-4-vermittelte (*Very Late Antigen 4*) Adhäsion auf VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) beobachtet. Zudem wurden unterschiedliche Adhäsions-induzierende Stimuli verwendet, welche über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zur Adhäsion führen. PMA, ein Struktur analog zu Diacylglycerol, ist zellpermeabel und wirkt über die Aktivierung der Proteinkinase C auf das Adhäsionsverhalten von Zellen. Die Induzierung

der Adhäsion mit diesem Molekül wurde durch Dynasore stark beeinträchtigt (Abbildung 3.3 A, D). Auch die Aktivierung der T-Zelladhäsion durch das Chemokin CXCL12, welches über den Chemokinrezeptor CXCR4 und das daran gekoppelte heterotrimere G-Protein eine Signalkaskade in Gang setzt, wurde durch die chemische Inhibition von Dynamin2 massiv herabgesetzt (Abbildung 3.3 B, D). Zudem wurde die Adhäsion von T-Lymphozyten induziert durch Signale des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und seiner Co-Stimulatoren, wie sie durch die Zugabe von aktivierenden Antikörpern (gerichtet gegen CD3 und CD28) induziert wurden, ebenfalls durch die Anwesenheit von Dynasore gestört (Abbildung 3.3 C).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass auch die PMA-induzierte Adhäsion von humanen CD4⁺ T-Zellen auf Fibronektin, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, von der Dynamin2 GTPase-Aktivität abhängig war (Abbildung 3.4 A). Dynasore ist ein zellpermeabler und schnell wirkender Inhibitor, welcher während der Versuche anwesend sein muss und schnell ausgewaschen werden kann. Um toxische Effekte auszuschließen und zu überprüfen, ob T-Zellen nach einer Inkubation mit Dynasore und dessen anschließender Entfernung wieder ein ungestörtes Adhäsionsverhalten aufweisen, wurden CD4⁺ T-Zellen für 90 min mit Dynasore inkubiert, anschließend gewaschen und schließlich in einem statischen Adhäsionsversuch eingesetzt. Wie erwartet adhärten die mit Dynasore vorinkubierten und anschließend gewaschenen Zellen mit gleicher Effizienz wie die mit DMSO inkubierten Kontrollzellen (Abbildung 3.4 B).

Da bisher nur der Einfluss von Dynamin2 auf die Adhäsion von primären humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht wurde, stellt sich die Frage, ob auch andere Lymphozyten-Typen in ihrer Integrin-vermittelten Adhäsion von der Aktivität der großen GTPase abhängig sind. Aus diesem Grund wurden weitere statische Adhäsionsversuche auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass auch primäre humane CD4⁺ Effektor-T-Zellen, NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen sowie CD19⁺ B-Zellen in ihrer Integrin-abhängigen Adhäsion stark auf die GTPase-Aktivität von Dynamin2 angewiesen sind, da die mit Dynasore inkubierten Lymphozyten im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen eine starke Adhäsionsdefizienz aufwiesen (Abbildung 3.4 C-J). Dieser Befund legt nahe, dass Dynamin2 nicht nur in der Integrin-vermittelten T-Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielt, sondern dass das Protein generell für die Adhäsion humaner Lymphozyten wichtig ist.

Da die GTPase-Aktivität von Dynamin2 in der vorliegenden Arbeit bisher nur mit Hilfe eines einzelnen chemischen Inhibitors beeinflusst wurde und chemische Inhibitoren wie Dynasore auch unspezifische Effekte haben können [165], wurden die Befunde bezüglich des Einflusses von Dynamin2 auf die Adhäsion von T-Lymphozyten mit weiteren Techniken überprüft. So wurde die Dynamin2 GTPase-Aktivität durch Zugabe eines al-

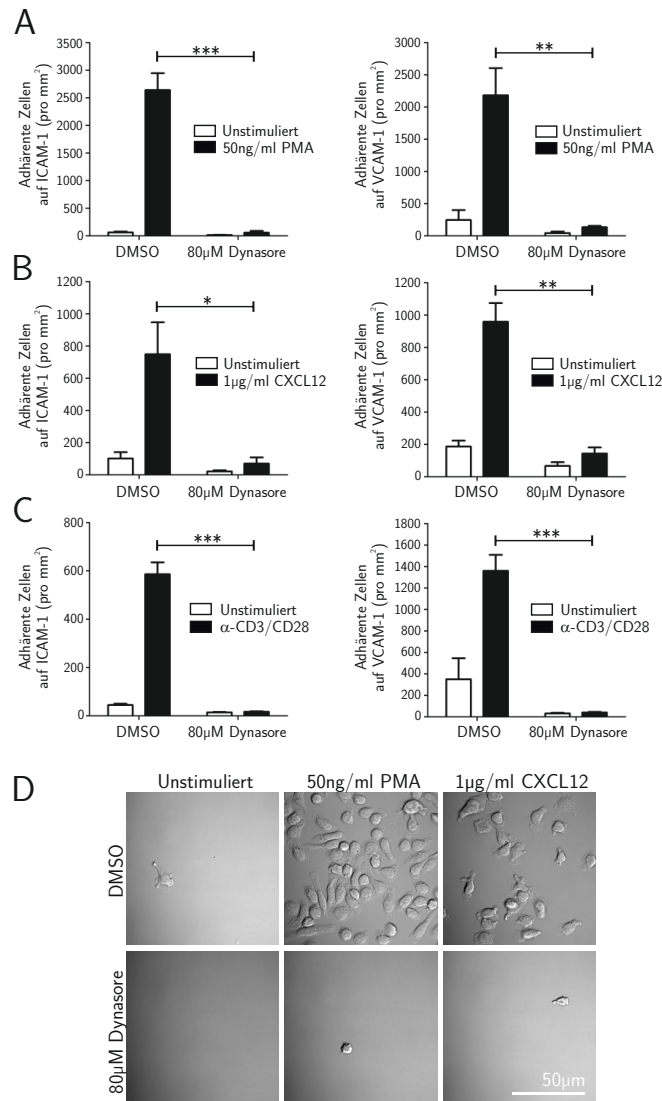


Abbildung 3.3: **Die Dynamin2 GTPase-Aktivität ist essentiell für die Integrin-vermittelte Adhäsion von humanen CD4⁺ T-Zellen unter statischen Bedingungen.** (A-C) Analyse der Adhäsion humaner primärer CD4⁺ T-Zellen unter statischen Bedingungen auf ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc. Die Lymphozyten wurden entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 μM Dynasore zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität inkubiert. Falls angegeben, wurde die Adhäsion durch Zugabe von (A, n = 3-5) 50 ng/ml PMA, (B, n = 3-5) 1 μg/ml CXCL12 oder (C, n = 3) α-CD3/CD28-beschichteten *Dynabeads* (1:1-Verhältnis zu Zellen) induziert. 45 min nach dem Aussäen der Zellen wurde die Anzahl adhärenter Zellen pro mm² quantifiziert. (D) Detaillierte Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) Aufnahmen repräsentativer ICAM-1-Fc beschichteter Areale mit adhären humanen CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit DMSO oder Dynasore und Stimulation, falls angegeben, mit 50 ng/ml PMA oder 1 μg/ml CXCL12. Mittelwert + S.E.M., *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

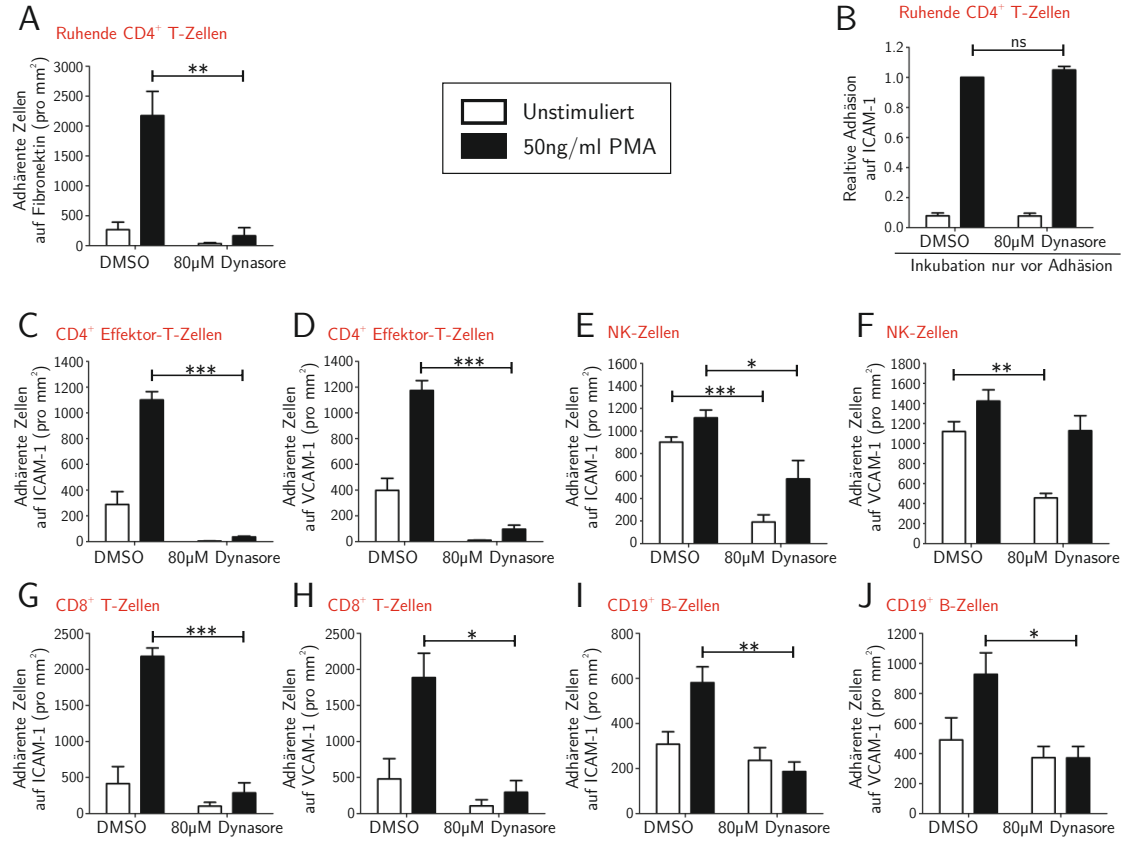


Abbildung 3.4: **Die Integrin-vermittelte statische Adhäsion verschiedener humaner Lymphozyten ist stark abhängig von Dynamin2.** (A, C-J) Analyse der Adhäsion verschiedener Typen primärer humaner Lymphozyten auf Fibronectin, ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc unter statischen Bedingungen. Die Lymphozyten wurden entweder mit DMSO (Kontrolle) oder 80 µM Dynasore (Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität) behandelt. Falls angegeben, wurde die Adhäsion durch die Zugabe von 50 ng/ml PMA induziert. 45 min nach dem Ausplattieren wurde die Anzahl adhärenter Lymphozyten pro mm² quantifiziert. Analysiert wurde die Adhäsion von (A, n = 3) ruhenden CD4⁺ T-Zellen auf Fibronectin, von CD4⁺ Effektor-T-Zellen (α-CD3/CD28-Antikörper für 72 h) auf (C, n = 3) ICAM-1-Fc und (D, n = 4) VCAM-1-Fc, von NK-Zellen auf (E, n = 4) ICAM-1-Fc und (F, n = 3) VCAM-1-Fc, von CD8⁺ T-Zellen auf (G, n = 3) ICAM-1-Fc und (H, n = 3) VCAM-1-Fc und von CD19⁺ B-Zellen auf (I, n = 4) ICAM-1-Fc und (J, n = 3) VCAM-1-Fc. Mittelwert + S.E.M., *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001. (B, n = 3) Analyse der statischen Adhäsion auf ICAM-1-Fc von ruhenden humanen CD4⁺ T-Zellen nach einer Inkubation mit DMSO oder 80 µM Dynasore für 1 h 45 min und anschließend dem Auswaschen der Moleküle. Falls angegeben, wurde die Adhäsion durch Zugabe von 50 ng/ml PMA induziert. Die Adhäsionseffizienz wurde relativ zu der PMA-stimulierten Kontrolle (DMSO, auf eins gesetzt) kalkuliert. Mittelwert (normalisiert) + S.E.M., ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

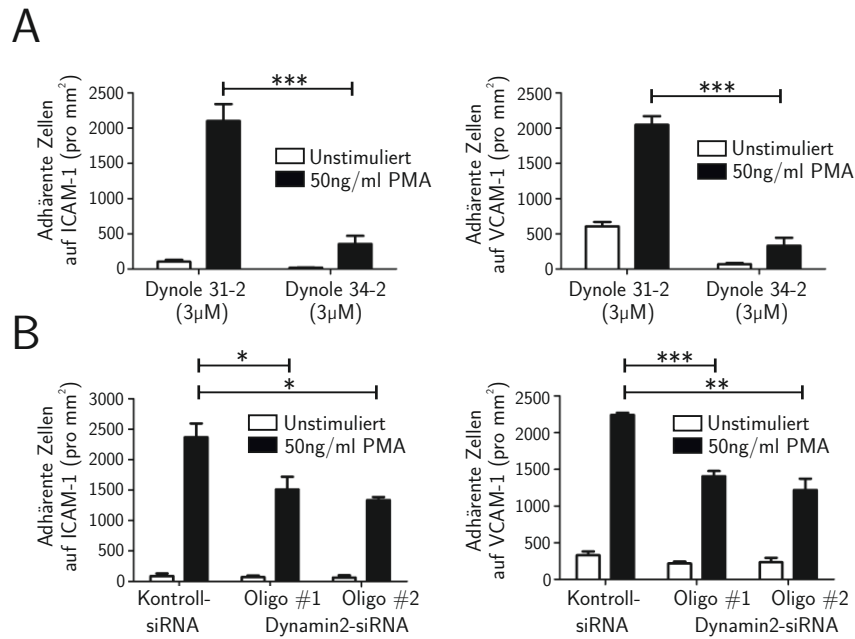


Abbildung 3.5: **Die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner CD4⁺ T-Zellen ist abhängig von der Aktivität und Expression von Dynamin2.** (A, n = 4) Analyse der statischen Adhäsion ruhender humaner CD4⁺ T-Lymphozyten auf ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc nach deren Behandlung mit 3 µM Dynole 31-2 als Kontrolle oder 3 µM Dynole 34-2 um die GTPase-Aktivität von Dynamin2 zu inhibieren. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert. 45 min nach dem Aussäen wurde die Anzahl der adhärenen T-Zellen pro mm² quantifiziert. (B, n = 3) Analyse der statischen Adhäsion ruhender humaner CD4⁺ T-Zellen auf entweder ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc 48 h nach deren Transfektion mit entweder Kontroll-siRNA oder Dynamin2-siRNA. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert. 45 min nach dem Aussäen wurde die Anzahl der adhärenen T-Zellen pro mm² quantifiziert. Mittelwert + S.E.M., *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

ternativen chemischen Inhibitors (Dynole 34-2) blockiert [166], welcher chemisch nicht verwandt mit Dynasore ist, was das Auftreten gleicher unpezifischer Seiteneffekte sehr unwahrscheinlich macht [157]. Tatsächlich führte auch die Inkubation primärer humaner CD4⁺ T-Zellen mit Dynole 34-2 zu einer stark verminderten Adhäsion auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc verglichen mit T-Zellen, welche mit dem chemisch nah verwandten, jedoch inaktiven Dynole 31-2 als Kontrolle inkubiert worden waren (Abbildung 3.5 A).

Neben der chemischen Inhibition der GTPase-Aktivität von Dynamin2 wurde zudem die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) angewendet, um die Expression von Dynamin2 in humanen T-Zellen herunterzuregulieren. Dafür wurden humane primäre CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen siRNA-Oligos transfiziert (eine Kontroll-siRNA und zwei unterschiedliche Dynamin2-siRNAs) und 48 h nach der Transfektion in einem statischen Adhäsionsversuch eingesetzt. Die von der Zelle aufgenommenen siRNAs führen zu einem

Abbau der mRNAs, gegen die sie gerichtet sind, und somit auch zu einer verminderten Expression des entsprechenden Proteins, welches die mRNAs codieren. Mit Hilfe dieser Technik konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dynamin2 einen wichtigen und positiven Einfluss auf die Adhäsion humaner $CD4^+$ T-Lymphozyten hat, da Zellen, welche mit Dynamin2-siRNA transfiziert worden waren, eine signifikant niedrigere PMA-stimulierte Adhäsion auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc aufwiesen als Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren (Abbildung 3.5 B). Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass sowohl die Expression als auch die GTPase-Aktivität von Dynamin2 eine essentielle Rolle in der Integrin-vermittelten Adhäsion humaner Lymphozyten spielen.

3.4 Dynamin2 reguliert die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner $CD4^+$ T-Zellen unter laminarer Strömung

T-Lymphozyten müssen unter physiologischen Bedingungen nicht nur statisch an andere Zellen oder die extrazelluläre Matrix binden, sondern auch unter laminarer Strömung. Dies ist beispielsweise bei der Extravasation aus den Blutgefäßen der Fall, bei der die Lymphozyten, trotz des herrschenden Flusses, an die Oberfläche der die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen binden müssen. In diesem Fall sind die adhärierenden beziehungsweise adhärenen Zellen starken Scherkräften ausgesetzt, die abhängig von der Flussgeschwindigkeit des Blutes und dem Durchmesser des entsprechenden Gefäßes sind. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Scherkräfte sich unmittelbar auf die Aktivierung von Integrinen auswirken und der Zelladhäsion in einer solchen Umgebung somit andere Regulationsmechanismen zu Grunde liegen [167]. Um zu untersuchen, ob Dynamin2 auch unter Flussbedingungen einen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Adhäsion hat, wurde ein Versuchsaufbau der Mikro-Fluidik angewendet, bei dem humane primäre $CD4^+$ T-Zellen in Suspension mit Hilfe einer Pumpe durch mit Integrin-Liganden beschichtete Mikrokanäle gezogen wurden. Dabei konnten die Scherkräfte, welche innerhalb des Kanals an der beschichteten Oberfläche anlagen, durch die Flussgeschwindigkeiten und die Größe des gewählten Kanals beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Scherkräften von 1 dyn/cm^2 bis $2,8 \text{ dyn/cm}^2$ gearbeitet, was denen innerhalb kleiner bis mittelgroßer Venen entspricht. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus konnte gezeigt werden, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner $CD4^+$ T-Zellen auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc, VCAM-1-Fc und CXCL12 unter laminarer Strömung ebenfalls durch Dynamin2 reguliert wird. T-Zellen, welche mit Dynasore inkubiert wurden, rollten nur an der Oberfläche entlang, ohne stabile Adhäsionen auszubilden, während die DMSO-behandelten Kontrollzellen stark auf der mit Integrin-Liganden und Chemo-

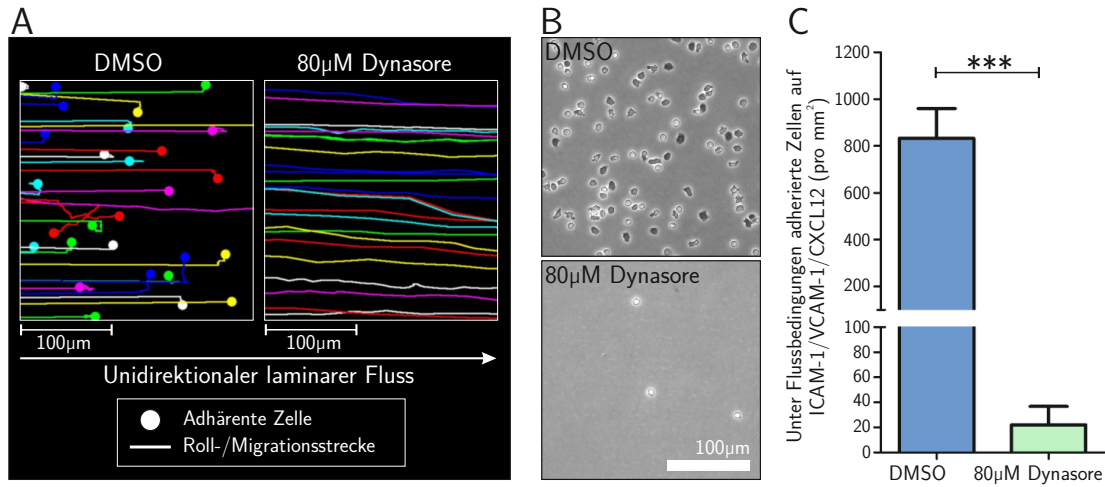


Abbildung 3.6: **Dynamin2 reguliert die Integrin-vermittelte T-Zelladhäsion unter Bedingungen laminaren Flusses.** Analyse der Adhäsion humaner primärer CD4⁺ T-Zellen auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc, VCAM-1-Fc und CXCL12 unter unidirektionalem laminarem Fluss (2,8 dyn/cm²). Die T-Lymphozyten wurden entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit Dynasore zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität behandelt. (A) Linien repräsentieren Roll- und Migrationsspuren der Zellen entlang der beschichteten Oberfläche unter laminarer Strömung. Punkte markieren adhärenen Zellen. (B) Phasenkontrast-Aufnahmen welche repräsentative Areale der beschichteten Oberfläche inklusive adhärenen T-Zellen zeigen. Die Aufnahmen wurden gemacht nachdem eine Zellsuspension für 30 min über die Oberfläche gespült und diese anschließend mit HBSS gewaschen worden war. (C) Endpunkt-Quantifizierung adhärenen T-Zellen pro mm² (zugehörig zu A und B, n = 4). Mittelwert + S.E.M., ***P ≤ 0,001. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

kin beschichteten Oberfläche adhärenen und im Anschluss daran teilweise auf dieser migrierten (Abbildung 3.6).

Um, wie auch schon bei der Analyse der statischen Adhäsion, die mit Dynasore erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde auch die Adhäsion unter laminarer Strömung mit humanen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt, welche entweder mit dem Dynamin2-Inhibitor Dynole 34-2 behandelt wurden oder welche 48 h zuvor mit Dynamin2-siRNA transfiziert worden waren. Auch diese beiden Methoden führten zu einer stark verschlechterten Adhäsion der T-Zellen unter Fluss-Bedingungen (Abbildung 3.7). Dies bekräftigt den durch Verwendung von Dynasore erhaltenen Befund, dass Dynamin2 auch für diese Form der Lymphozyten-Adhäsion von großer Bedeutung ist.

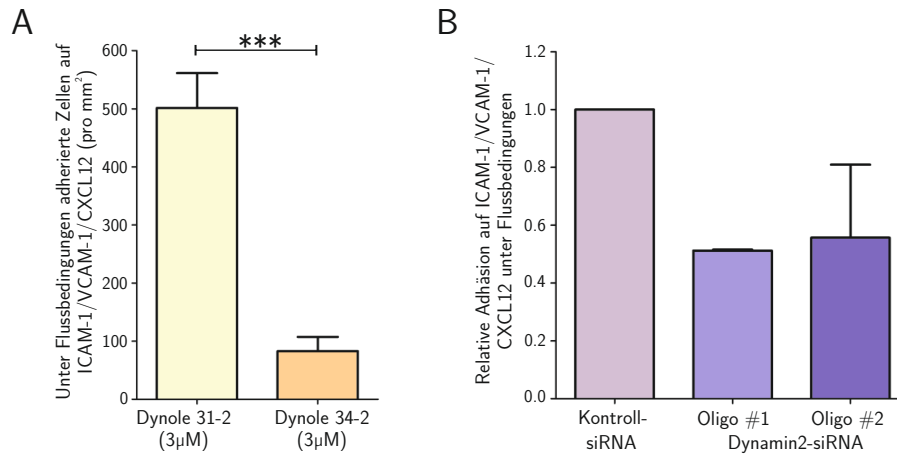


Abbildung 3.7: **Die Integrin-vermittelte T-Zelladhäsion unter Fluss-Bedingungen ist abhängig von der GTPase-Aktivität sowie der Expression von Dynamin2.** Endpunkt-Analyse der Adhäsion humaner primärer CD4⁺ T-Zellen auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc, VCAM-1-Fc und CXCL12 unter unidirektionalem laminarem Fluss (1 dyn/cm², 30 min). (**A**, n = 6) Die T-Lymphozyten wurden entweder mit 3 µM Dynole 31-2 als Kontrolle oder mit 3 µM Dynole 34-2 zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität behandelt. Die Anzahl adhärenen Zellen pro mm² wurde quantifiziert. (**B**, n = 2) Die T-Zellen wurden 48 h zuvor mit entweder einer Kontroll-siRNA oder einer siRNA gerichtet gegen die mRNA von Dynamin2 transfiziert. Der Wert adhärenen Zellen pro mm² in der Kontrolle wurde eins gesetzt und anschließend die dazu relative Adhäsion der mit Dynamin2-siRNA transfizierten T-Zellen ermittelt. Mittelwert + S.E.M., ***P ≤ 0,001. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.5 Die Integrin-abhängige, aber nicht die Integrin-unabhängige Migration humaner CD4⁺ T-Zellen wird durch Dynamin2 reguliert

Eine schnelle und effektive Immunantwort ist stark auf eine hohe und adaptive Dynamik der partizipierenden Immunzellen angewiesen. Diese umfasst nicht nur die Fähigkeit der Leukozyten, ihr Adhäsionsverhalten umgehend an ihre entsprechende Umgebung anzupassen, sondern auch eine schnelle und zielgerichtete Migration. Um zu analysieren, ob Dynamin2 zusätzlich zur Adhäsion auch bei der Motilität von Lymphozyten eine Rolle spielt, wurden humane CD4⁺ T-Zellen auf 2-dimensionale mit ICAM-1-Fc beschichtete Oberflächen ausgesät. Dann wurden die Zellen teilweise mit dem Chemokin CXCL12 versetzt, um Chemokinese, also eine ungerichtete Migration ausgelöst durch ein Chemokin, zu stimulieren. DMSO-behandelte Kontrollzellen konnten so massiv in ihrem Migrationsverhalten stimuliert werden, wohingegen T-Zellen, welche mit Dynasore behandelt worden waren, auch nach der Stimulation mit CXCL12 keinerlei Motilität auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc aufwiesen (Abbildung 3.8).

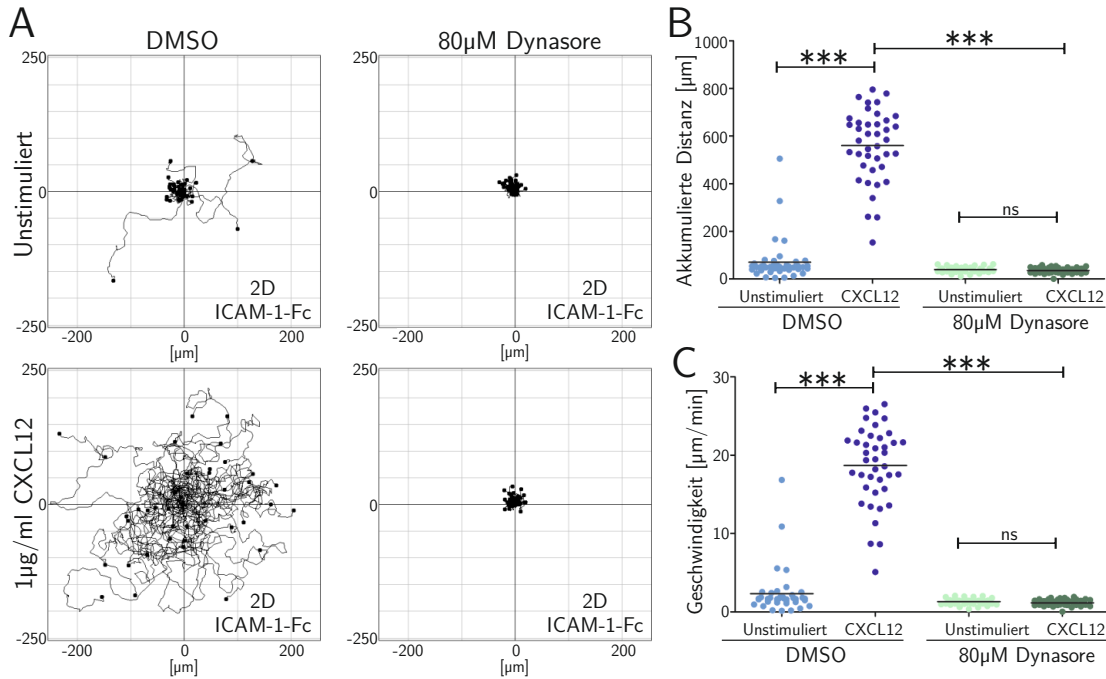


Abbildung 3.8: **Dynamin2 reguliert die Migration humaner CD4⁺ T-Zellen auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc.** Analyse der Migration primärer CD4⁺ T-Zellen auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc. Die Zellen wurden, falls angegeben, mit 1 µg/ml CXCL12 stimuliert und für 30 min mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. (A) Migrationsspur der Zellen für einen Zeitraum von 30 min nach Stimulation. (B) Quantifizierung der akkumulierten Distanz sowie (C) der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Zellen zugehörig zu (A). Die Ergebnisse zeigen die Auswertung eines repräsentativen Experimentes von drei verschiedenen unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen. *** $P \leq 0,001$, ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Obwohl eine bestimmte Grundmotilität einzelner unstimulierter DMSO-behandelter Kontrollzellen zu beobachten war, wurde die effiziente Migration aller Zellen erst durch die Zugabe des Chemokins CXCL12 stimuliert. CXCL12 bindet an den transmembranen Chemokinrezeptor CXCR4, welcher nach der Bindung seines Liganden eine Signalkaskade über ein heterotrimeres G-Protein induziert. Des Weiteren wird der Rezeptor nach erfolgter Liganden-Bindung internalisiert, was vorzugsweise dem *Recycling* des Rezeptors, aber auch einer De-Sensitivierung gegenüber dem Chemokin dienen kann. Ob die Internalisierung auch wichtig für die induzierte Signalkaskade des Rezeptors ist, ist bisher unzureichend geklärt. Da mit der chemischen Inhibition von Dynamin2 ein wichtiger Regulator der Endozytose ausgeschaltet wurde, stellt sich die Frage, ob die massive Defizienz im Migrationsverhalten der Dynamin2-inhibierten T-Lymphozyten auf eine fehlerhafte Internalisierung des Rezeptors zurückzuführen sein könnte. Um dies zu analysieren, wurden ruhende primäre CD4⁺ T-Zellen entweder als Kontrolle mit DMSO oder zur Blo-

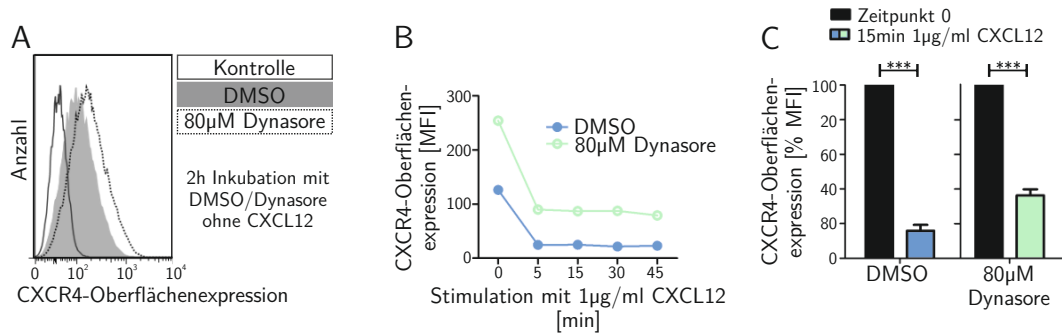


Abbildung 3.9: **Dynamin2 reguliert die Liganden-unabhängige, jedoch nicht die Liganden-abhängige Internalisierung von CXCR4 in humanen CD4⁺ T-Zellen.** Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4-Internalisierung in primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen. Die Lymphozyten wurden entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit 80 µM Dynasore (chemische Inhibition von Dynamin2) behandelt. **(A)** Repräsentatives Histogramm, welches die relative CXCR4-Oberflächenexpression anhand der detektierten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) auf unstimulierten T-Lymphozyten nach einer Inkubation von 2 h mit entweder DMSO oder Dynasore zeigt. **(B)** Liganden-abhängige Internalisierung von CXCR4 nach Zugabe von 1 µg/ml CXCL12 zu den T-Zellen im Zeitraum von 0 bis 45 min. **(C, n = 5)** Relative Oberflächenexpression von CXCR4 auf T-Zellen 15 min nach der Zugabe von 1 µg/ml CXCL12. Messungen von DMSO- und Dynasore-behandelten unstimulierten Proben wurden jeweils auf 100 % gesetzt. Mittelwert + S.E.M., ***P ≤ 0,001, MFI bedeutet mittlere Fluoreszenzintensität.

ckierung der Dynamin2 GTPase-Aktivität mit 80 µM Dynasore für 2 h inkubiert und anschließend in den unstimulierten Zellen die Oberflächenexpression von CXCR4 mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen. In der Tat konnte so gezeigt werden, dass die Expression von CXCR4 auf der Oberfläche unstimulierter T-Zellen nach der Inhibition von Dynamin2 innerhalb von 2 h auf fast das Doppelte ansteigt (Abbildung 3.9 A, B). Interessanterweise wurde CXCR4 jedoch nach der Zugabe seines Liganden CXCL12 auch in Dynasore-behandelten T-Lymphozyten massiv internalisiert, wobei die Internalisierung hierbei nach 5 min bereits maximal abgelaufen war und innerhalb von weiteren 40 min die Oberflächen-Expression von CXCR4 durch die Anwesenheit von CXCL12 nicht noch weiter abgesenkt werden konnte (Abbildung 3.9 B, C). Obwohl T-Zellen, deren Dynamin2 GTPase-Aktivität durch die Zugabe von Dynasore inhibiert worden war, letztlich eine höhere verbleibende Expression von CXCR4 auf ihrer Oberfläche, sowie prozentual gesehen auf die Gesamtmenge der Expression eine etwas geringere Internalisierungsrate des Chemokinrezeptors aufwiesen (Abbildung 3.9 B, C), wurde in diesen Zellen doch an absoluter Menge mehr CXCR4 internalisiert als in den Kontrollzellen (Abbildung 3.9 B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Dynamin2 vorzugsweise wichtig für die Liganden-unabhängige Internalisierung von CXCR4 in unstimulierten T-Zellen ist, die Liganden-abhängige Internalisierung des Rezeptors jedoch auch in Zellen mit chemisch blockiertem Dynamin2 fehlerfrei abläuft.

Da die Liganden-induzierte Internalisierung von CXCR4 auch in Zellen mit inhibierter Dynamin2-Aktivität funktioniert, kann dies nicht die Erklärung für die fehlerhafte Migration in Dynasore-behandelten Zellen sein. Dennoch stellt sich die Frage, ob die T-Zellen nach der Behandlung mit dem Inhibitor generell auf das Chemokin CXCL12 funktionell reagieren können. Um dies zu überprüfen, wurde mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer ein Chemotaxis-Versuch durchgeführt. Bei diesem Versuchsaufbau, der auch *Transwell* genannt wird, werden Zellen in das obere Kompartiment einer Zellkulturschale gegeben, welches durch eine poröse Membran von dem unteren Kompartiment der Schale getrennt ist. In das untere Kompartiment kann nun, falls gewünscht, Chemokin-haltiges Medium gegeben werden, was die Bildung eines Chemokin-Gradienten durch die Membran zu Folge hat. Dieser Gradient kann die Zellen dazu veranlassen, chemotaktisch geleitet durch die poröse Membran hin zu der höheren Konzentration des Chemokins zu migrieren. Da die Bewegung durch die Membran nur durch eine intakte Chemokin-induzierte Signaltransduktion stimuliert wird, lässt sich deren Funktionalität sowie ein generelles Motilitäts-Potenzial der Zellen mit diesem Versuch gut überprüfen. Interessanterweise waren DMSO- wie auch Dynasore-behandelte humane CD4⁺ T-Zellen gleichermaßen in der Lage, die poröse Membran entlang eines CXCL12-Gradienten zu passieren, was dafür spricht, dass CXCL12 auch in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 eine migratorische Antwort hervorrufen kann (Abbildung 3.10 A).

Die Migration von Immunzellen auf 2-dimensionalen Oberflächen ist stark abhängig von der Adhäsion über Integrine. Integrine dienen als Linker zwischen dem Kraft-erzeugenden Apparat innerhalb der Zelle, dem Aktin-Myosin-Zytoskelett, und der Umgebung der migrierenden Zelle [26, 168]. Sobald sich Immunzellen jedoch in einer räumlich begrenzten Umgebung befinden, in der sie sozusagen eingequetscht sind, brauchen sie für ihre Fortbewegung keine adhäsiven Verbindungen zu ihrer Umgebung mehr, also auch keine Integrin-vermittelte Adhäsion. In einer solchen Umgebung können Immunzellen rein durch ein Zusammenspiel von der Formation Aktin-basierter Protrusionen sowie Aktin-Myosin-getriebener Kontraktionen migrieren [24, 25]. Da Dynasore-behandelte humane T-Zellen nicht auf einer 2-dimensionalen ICAM-1-Fc-beschichteten Oberfläche migrierten, jedoch in einem *Transwell*-Migrations-Versuch keine Abnormalitäten aufwiesen, könnte die Erklärung für die gestörte Migration auf der 2-dimensionalen Oberfläche in der zuvor beschriebenen Adhäsions-Defizienz der Zellen liegen. Um dies zu überprüfen, wurden primäre CD4⁺ T-Zellen in ein 3-dimensionales Kollagen-Gel eingebettet. Kollagen ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und weist ebenfalls Bindestellen für Integrine auf. Die Migration der T-Zellen wurde dann durch die uniforme Zugabe von CXCL12 induziert. In der Tat konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass im Vergleich zu unstimulierten Zellen sowohl DMSO- als auch Dynasore-behandelte T-Zellen eine sehr hohe CXCL12-induzierte Motilität innerhalb des Kollagen-Gels aufwiesen (Abbildung

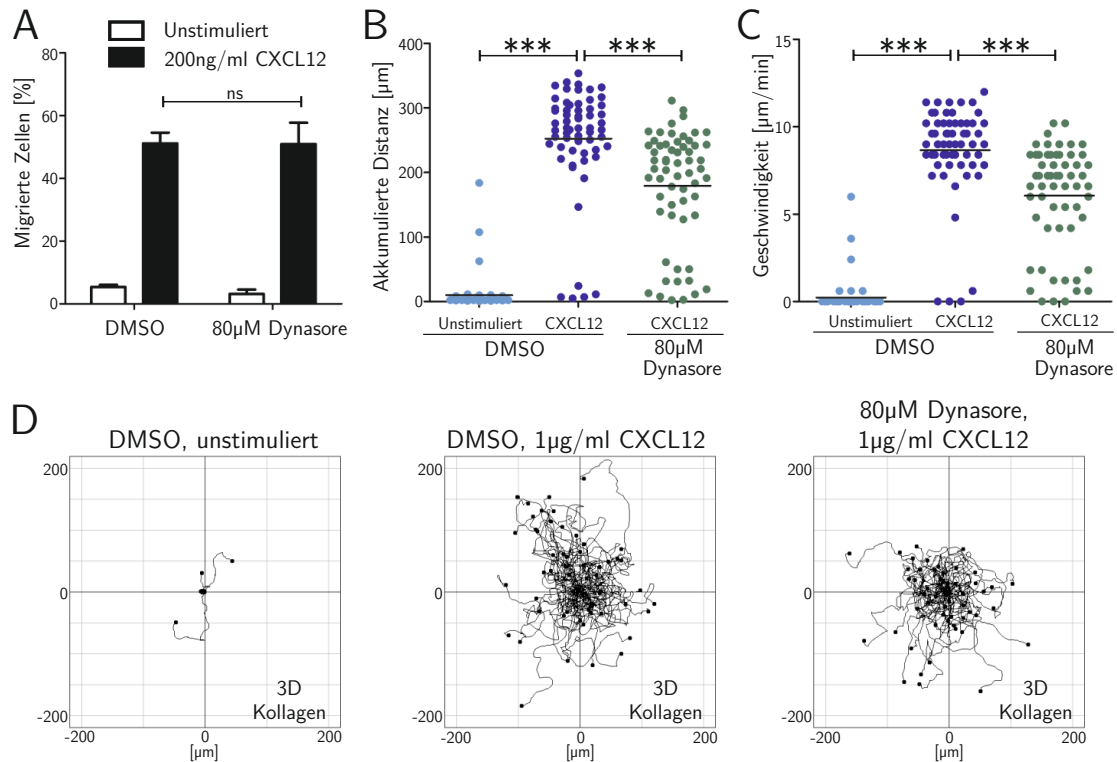


Abbildung 3.10: **Dynamamin2 hat keinen oder wenig Einfluss auf die Migration humaner T-Zellen durch einen Transwell-Filter oder innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels.** Analyse der CXCL12-induzierten Migration humaner ruhender CD4⁺ T-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit DMSO (Kontrolle) oder 80 µM Dynasore (Dynamamin2-Inhibition) inkubiert. Falls angegeben, wurde das Chemokin CXCL12 zur Stimulation der Migration den Zellen hinzugefügt. (**A**, n = 3, Mittelwert + S.E.M.) Quantifizierung der T-Zell-Chemotaxis durch eine Polycarbonat-Membran (Porengröße 3 µm) 4 h nachdem die Zellen ausgesät worden waren. Die Anzahl ursprünglich eingesetzter Zellen wurde auf 100 % gesetzt. (**B**) Quantifizierung der akkumulierten Distanz sowie (**C**) der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit einzelner Lymphozyten, welche innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels migrierten. (**D**) Migrationsspuren der Zellen innerhalb eines Kollagen-Gels für einen Zeitraum von 30 min nach erfolgter Stimulation (zugehörig zu (**B**) und (**C**)). Die Ergebnisse zeigen die Auswertung eines repräsentativen Experimentes von drei verschiedenen unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen. ***P ≤ 0,001, ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.10 B-D). Obwohl die Migrationsgeschwindigkeit von T-Lymphozyten mit inhibiertem Dynamamin2 auch hier etwas geringer war als die der Kontrollzellen, besteht ein deutlicher Unterschied zu dem Migrationsversuch auf einer 2-dimensionalen Oberfläche, bei dem Dynasore-behandelte Zellen absolut kein migratorisches Verhalten aufwiesen (Abbildung 3.8).

Der deutliche Unterschied zwischen dem Migrationspotenzial Dynasore-behandelter T-Zellen auf einer 2-dimensionalen ICAM-1-Fc-beschichteten Oberfläche und innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels legt die Erklärung nahe, dass Dynamamin2 nur eine Rolle

in der Integrin-vermittelten Migration von Lymphozyten spielt. Dennoch handelt es sich bei ICAM-1 und Kollagen um sehr unterschiedliche Integrin-Liganden. So wird ICAM-1 ausschließlich von β_2 -Integrinen gebunden, während Kollagen vor allem ein Ligand für β_1 -Integrine darstellt [169]. Um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied im Migrationsverhalten Dynasore-behandelter T-Zellen nicht auf die Funktion spezifischer Integrin-Subtypen zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die CXCL12-induzierte Chemokinese humaner $CD4^+$ T-Zellen auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit dem β_1 -Integrin-Liganden VCAM-1-Fc durchgeführt. Wie erwartet, zeigten T-Zellen mit inhibierter Dynamin2 GTPase-Aktivität auch auf diesem Liganden keinerlei Motilität, während die stimulierten Kontrollzellen schnell und effizient migrieren konnten (Abbildung 3.11).

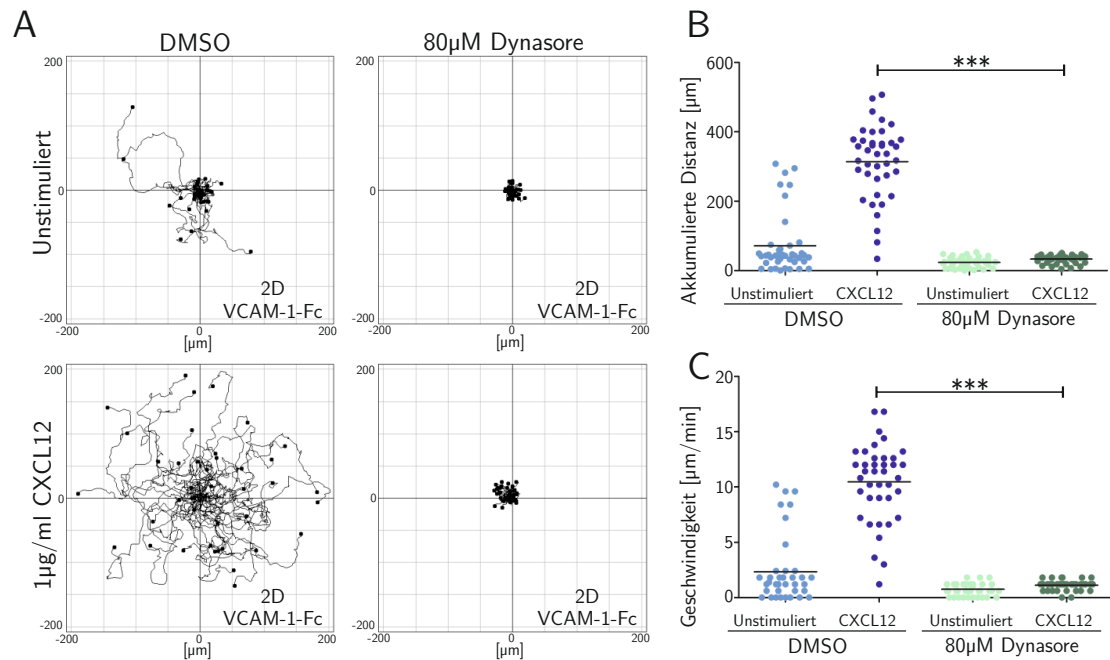


Abbildung 3.11: **Dynamin2 reguliert die Migration humaner $CD4^+$ T-Zellen auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit VCAM-1-Fc.** Analyse der Migration primärer $CD4^+$ T-Zellen auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit VCAM-1-Fc. Die Zellen wurden, falls angegeben, mit 1 µg/ml CXCL12 stimuliert und für 30 min mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. (A) Migrationsspuren der Zellen für einen Zeitraum von 30 min nach Stimulation. (B) Quantifizierung der akkumulierten Distanz sowie (C) der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Zellen zugehörig zu (A). Die Ergebnisse zeigen die Auswertung eines repräsentativen Experimentes von drei verschiedenen unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen. *** $P \leq 0,001$, ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Dies spricht sehr stark dafür, dass der beobachtete Unterschied im Migrationsverhalten Dynasore-behandelter T-Lymphozyten zwischen 2- und 3-dimensionaler Umgebung nicht

auf eine unterschiedliche Regulation spezifischer Integrin-Subtypen zurückzuführen ist. Vielmehr sind die Daten mit der Erklärung zu interpretieren, dass Dynamin2 spezifisch die Integrin-abhängige Migration von T-Zellen reguliert, jedoch keine oder eine nur sehr geringe Rolle in deren Integrin-unabhängigem Migrationsmodus spielt.

3.6 Die chemische Inhibition des zellulären Vesikeltransports hat keinen Einfluss auf die Adhäsion humaner T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner Lymphozyten sowie davon abhängige Prozesse durch die große GTP-ase Dynamin2 reguliert werden. Dynamin2 wurde bisher vor allem im Kontext der Endozytose studiert, bei der dem Protein die wichtige Aufgabe zuteil wird, mit Clathrin beschichtete Einsackungen der Plasmamembran abzutrennen. Zudem spielt Dynamin2 durch seine Funktion in der Vesikelabschnürung auch eine wichtige Rolle bei dem intrazellulären Vesikeltransport [80]. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Adhäsionsdefizienz in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 auf eine generelle Fehlregulation des Vesikeltransports zurückzuführen ist, wurden statische Adhäsionsversuche mit primären $CD4^+$ T-Lymphozyten durchgeführt, welche zuvor mit verschiedenen Dynamin2-unabhängigen chemischen Inhibitoren, gerichtet gegen Endozytose, Exozytose oder intrazellulären Vesikeltransport, inkubiert worden waren. Überraschenderweise führte die Inkubation der T-Zellen mit Chlorpromazin, welches zu einem Verlust von Clathrin sowie des AP-2-Adapterkomplexes von der Zellmembran führt und dadurch die Endozytose hemmt [170], zu keiner Verminderung in der Integrin-vermittelten Adhäsion der Zellen auf ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc (Abbildung 3.12 A). Auch das Blockieren der Endozytose durch die Zugabe von Monodansylcadaverin, dessen Wirkungsweise eine Stabilisierung der Clathrin-beschichteten Einsackungen an der Plasmamembran zur Folge hat [171], hatte keine Folgen für die Adhäsion von $CD4^+$ T-Lymphozyten auf Integrin-Liganden (Abbildung 3.12 B). Brefeldin A, welches zu einer Stabilisierung des Arf1-GDP-Sec7-Komplexes während des GDP-GTP-Austausches durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) an Arf1 (*ADP-Ribosylation Factor 1*) führt, inhibiert den Vesikeltransport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat sowie die Exozytose des endozytischen Kompartiments [172]. Jedoch führte auch die Inkubation mit diesem Lacton-Antibiotikum zu keiner Verminderung der T-Zelladhäsion auf ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc (Abbildung 3.12 C). Der Inhibitor Exo1, welcher spezifisch den intrazellulären Transport zwischen ER und Golgi-Apparat inhibiert, Endosomen jedoch nicht beeinflusst [173], zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Adhäsion humaner $CD4^+$ T-Zellen unter statischen Bedingungen (Abbildung 3.12 D). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse gegen

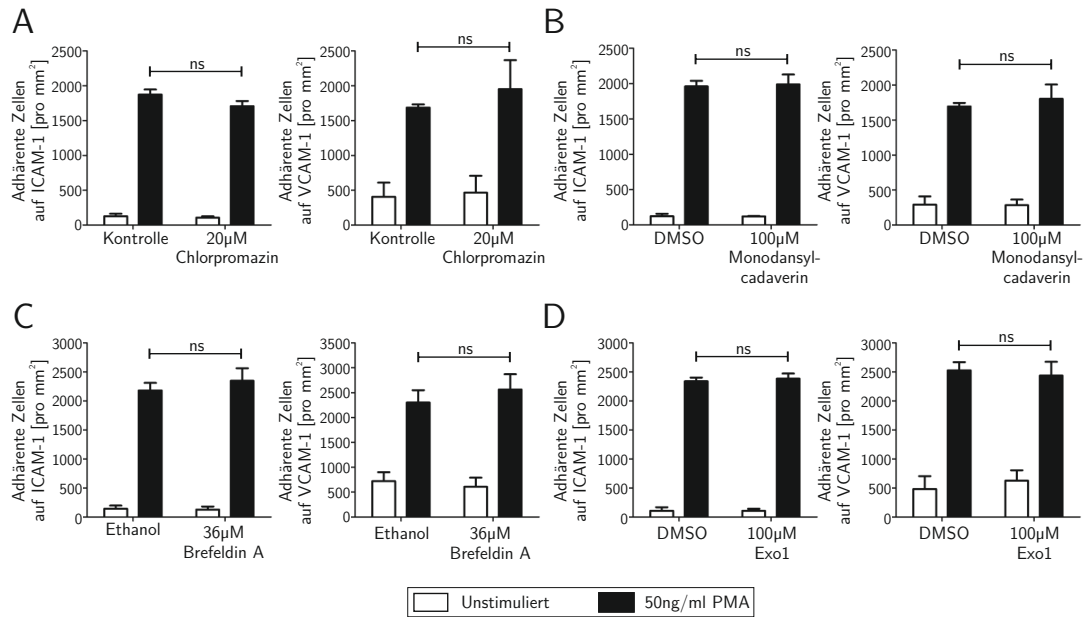


Abbildung 3.12: **Verschiedene Dynamin2-unabhängige Inhibitoren für Endo- und Exozytose haben keinen Einfluss auf die Adhäsion humaner T-Zellen.** Analyse der statischen Adhäsion primärer CD4⁺ T-Zellen auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc. Falls angegeben, wurde die Adhäsion durch die Zugabe von 50 ng/ml PMA stimuliert. 45 min nach dem Ausplattieren der Zellen wurden die adhärenz Zellen pro mm² quantifiziert. Die Endozytose wurde durch Zugabe von (A, n = 3) 20 µM Chlorpromazin oder (B, n = 3) 100 µM Monodansylcadaverin inhibiert. Die Exozytose wurde durch (C, n = 3) 36 µM Brefeldin A oder (D, n = 3) 100 µM Exo1 chemisch blockiert. Mittelwert + S.E.M., ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

die Hypothese, dass eine gestörte Regulation des vesikulären Transports der Grund des Adhäsionsverlusts in T-Zellen ist, welche kein funktionsfähiges Dynamin2 beinhalten.

3.7 F-Aktin-Polymerisierung wird partiell durch Dynamin2 reguliert, ist jedoch nicht essentiell für die Adhäsion humaner CD4⁺ T-Zellen

Neben der Regulation von intrazellulärem Vesikeltransport wird Dynamin2 auch in der Regulation des F-Aktin-Zytoskeletts impliziert [111]. Dynamin2 ist dabei in der Lage, F-Aktin zu binden und dessen Polymerisierung zu beeinflussen [174]. Da die Mechanik von Zellen stark vom Zytoskelett abhängig ist [175], drängt sich die Frage auf, ob Dynamin2 nur durch seinen Einfluss auf die Dynamik von F-Aktin eine essentielle Rolle in der Integrin-vermittelten T-Zelladhäsion spielt. Um dies zu analysieren, sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob Dynamin2 auch in humanen T-Lymphozyten direkt mit

F-Aktin interagiert. Hierfür wurden mit Dynamin2-eGFP und Lifeact-RFP transfizierte Jurkat E6.1 T-Zellen mit Hilfe hochauflösender konfokaler Mikroskopie untersucht. Fokussiert wurde dabei auf den Zellkortex, welcher aus einem Netzwerk von Aktinfilamenten besteht und durch den F-Aktin-Marker Lifeact-RFP entsprechend markiert wurde, ohne dessen Dynamik zu beeinflussen [135]. In der Tat konnte mit Hilfe dieser Methode eine direkte und spezifische Rekrutierung von Dynamin2 an Aktinfilamenten des zellulären Kortex beobachtet werden, wobei Dynamin2 eine hohe Dynamik an diesen Strukturen aufwies (Abbildung 3.13).

Dies lässt die Vermutung zu, dass Dynamin2 auch in T-Zellen einen Einfluss auf die Polymerisierung von F-Aktin haben könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden primäre humane CD4⁺ T-Zellen zunächst mit DMSO (als Kontrolle) oder mit Dynasore (zur Inhibition von Dynamin2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Chemokin CXCL12 oder dem Phorbol ester PMA stimuliert. Da bekannt ist, dass Integrinhaltige Adhäsionskomplexe F-Aktin-basierte Membranprotrusionen stabilisieren können [168], wurde der Versuch mit Zellen in Suspension durchgeführt, um den Einfluss von Adhäsionsprozessen auf das Ergebnis so minimal wie möglich zu halten. Das F-Aktin-Zytoskelett wurde schließlich mit fluorochromiertem Phalloidin markiert und die Zellen anschließend in einem konfokalen LSM analysiert.

Wie in Abbildung 3.14 A zu sehen ist, wiesen unstimulierte T-Zellen kaum polymerisiertes F-Aktin auf. Die Stimulation DMSO-behandelter Kontrollzellen mit CXCL12 führte jedoch zu einer starken Polarisierung der Zellmorphologie sowie zu einer hohen F-Aktin-Polymerisierung am Vorderende der Zellen, dem Lamellipodium, sowie auch am Hinterende der Zelle, dem Uropod. Im Gegensatz dazu fielen Polarisierung sowie F-Aktin-Expression in Dynasore-behandelten Zellen weitaus weniger deutlich aus. Die Lamellipodien am Vorderende wurden zwar gebildet, waren jedoch verkümmert und wesentlich kleiner, der Uropod wurde gar nicht mehr geformt (Abbildung 3.14 A). Die PMA-stimulierte F-Aktin-Polymerisierung wurde ebenfalls durch die chemische Inhibition von Dynamin2 stark beeinträchtigt. Während die Kontrollzellen nach Zugabe des Diacylglycerol-Strukturanalogs eine massive Erhöhung in der Expression von F-Aktin aufwiesen und an mehreren Stellen auf der Oberfläche F-Aktin-basierte Membranprotrusionen, sogenannte Pseudopodien, formten, konnte bei Dynasore-behandelten Zellen nur ein leichter Anstieg im F-Aktin-Gehalt der Zellen beobachtet werden, welcher zu keiner starken Formation von Pseudopodien führte (Abbildung 3.14 A). Auch eine durchflusszytometrische Analyse zeigte eine zwar nicht vollständig, aber signifikant verringerte PMA-stimulierte F-Aktin-Polymerisierung in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 (Abbildung 3.14 B).

Um zu untersuchen, ob eine fehlerhafte Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Lymphozyten

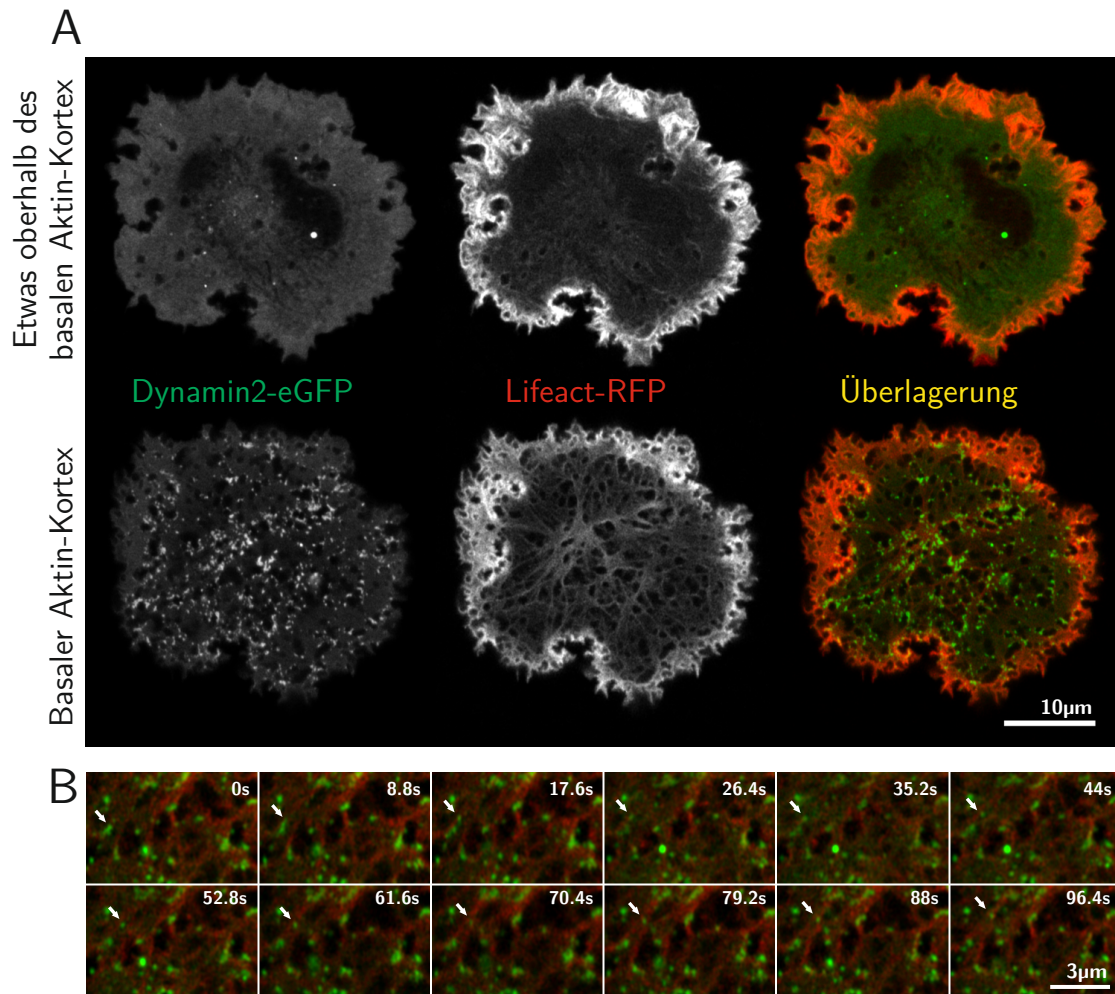


Abbildung 3.13: **Dynamin2-eGFP interagiert dynamisch mit Aktinfilamenten des Zellkortex.** Analyse der Lokalisation von Dynamin2-eGFP und des F-Aktin-Zytoskeletts (markiert durch Lifeact-RFP) in adhärenen Jurkat E6.1 T-Zellen mit Hilfe hochauflösender konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie. Die Zelle ist auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc und aktivierenden Antikörpern (α -CD3 und α -CD28) adhären. (A) Übersichtsaufnahme der Zelle mit Fokus geringfügig oberhalb sowie genau auf dem basalen Aktin-Kortex. (B) Detailaufnahme eines Ausschnittes des basalen Aktin-Kortex über eine Zeit von 96,4s, wobei alle 8,8s ein Bild aufgenommen wurde. Der Pfeil markiert ein Beispiel für die dynamische Bewegung von Dynamin2-eGFP entlang eines Aktinfilaments.

durch eine verringerte oder sogar komplett inhibierte F-Aktin-Polymerisierung ausgelöst werden kann, wurden humane $CD4^+$ T-Zellen mit spezifischen und sehr potenten F-Aktin-Inhibitoren versetzt und anschließend die statische Adhäsion der Zellen überprüft. Verwendet wurden hierfür einerseits Cytochalasin D, ein Mykotoxin, welches an Aktinfilamente bindet und deren Polymerisierung hemmt [176], sowie Latrunculin A, ein Makrolid-Toxin. Latrunculine werden in marinen Lebewesen produziert und verhindern die Bindung des monomeren globulären Aktins an Adenosintriphosphat (ATP), welches

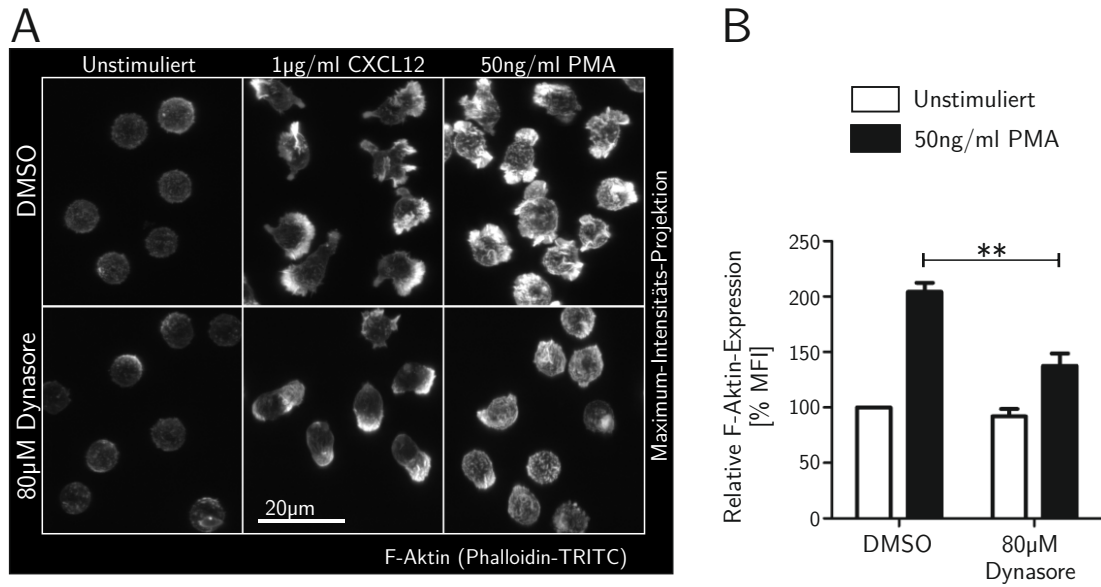


Abbildung 3.14: **Dynamin2 reguliert partiell die F-Aktin-Polymerisierung in humanen CD4⁺ T-Zellen.** Analyse der F-Aktin-Polymerisierung in Phalloidin-TRITC markierten primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen in Suspension. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt, die Dynamin2 GTPase-Aktivität wurde durch Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. Falls angegeben, wurde die F-Aktin-Polymerisierung durch die Zugabe von 1 µg/ml CXCL12 oder 50 ng/ml PMA stimuliert. (A) Maximum-Intensitäts-Projektionen von Z-Stapeln (0,3 µm Intervall) aufgenommen mit einem konfokalen LSM 15 min nach Stimulation der T-Zellen. (B, n=5) Analyse der relativen F-Aktin-Expression in humanen T-Zellen 45 min nach der Stimulation mit Hilfe eines Durchflusssytometers. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von unstimulierten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt. Mittelwert + S.E.M., **P ≤ 0,01. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

daraufhin nicht mehr zu F-Aktin polymerisieren kann [177]. Interessanterweise führte weder die Inkubation mit Cytochalasin D noch mit Latrunculin A zu einer signifikanten Reduktion in der Adhäsion primärer CD4⁺ T-Zellen auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc (Abbildung 3.15 A, B). Mittels Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (DIC) konnte jedoch eine massive Störung des Ausbreitens dieser T-Zellen auf dem Substrat nach erfolgter Adhäsion beobachtet werden, während sie dennoch mit abgerundeter Morphologie adhärten (Abbildung 3.15 C). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Adhäsionsdefizite humaner T-Zellen ohne Dynamin2-Aktivität nicht auf deren verringerte F-Aktin-Polymerisierung zurückzuführen sind.

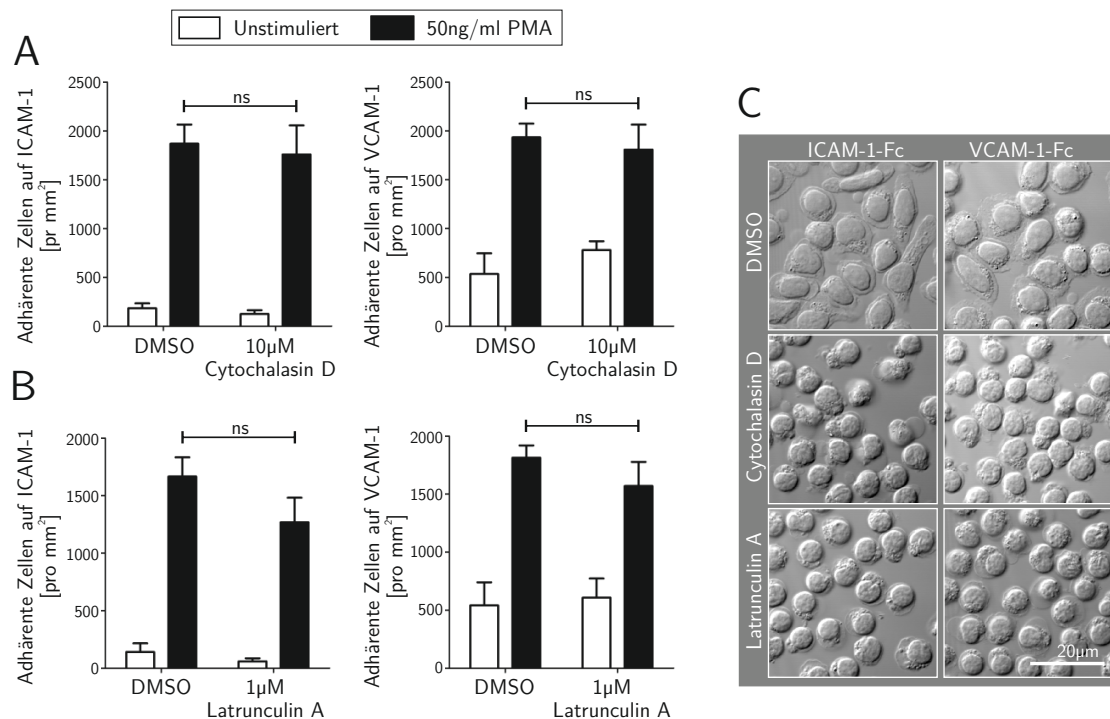


Abbildung 3.15: **F-Aktin-Polymerisierung ist nicht essentiell für die Adhäsion humaner CD4⁺ T-Zellen, jedoch für ihr Ausbreiten auf einem Substrat.** Analyse der statischen Adhäsion primärer ruhender CD4⁺ T-Zellen auf entweder ICAM-1-Fc oder VCAM-1-Fc nach der Inhibition der F-Aktin-Polymerisierung. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert. 45 min nach dem Aussäen wurde die Anzahl adherenter T-Zellen pro mm² quantifiziert. Die F-Aktin-Polymerisierung wurde durch Zugabe von (A, n = 4) 10 µM Cytochalasin D oder (B, n = 3) 1 µM Latrunculin A inhibiert. (C) Detaillierte DIC-Aufnahmen repräsentativer ICAM-1-Fc- oder VCAM-1-Fc-beschichteter Areale mit PMA-stimulierten adherenten CD4⁺ T-Zellen nach deren Behandlung mit Cytochalasin D oder Latrunculin A. Mittelwert + S.E.M., ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.8 Die Aktivierung von Akt und Erk ist nicht abhängig von der GTPase-Aktivität von Dynamin2

Da mit der chemischen Inhibition von Dynamin2 die Aktivität eines Proteins abgeschaltet wird, welches Einfluss auf verschiedene, sehr wichtige Zellfunktionen hat, stellt sich die Frage, ob dadurch ein generelles Problem bei der zellulären Signaltransduktion entsteht, was letztlich auch zu einer de-regulierten Zelladhäsion führen könnte. Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivierung von Erk1/2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase*), auch bekannt als Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (p44/42 MAPK), analysiert. Die Erk1/2-Signalkaskade kann durch viele verschiedene externe Stimuli ausgelöst werden und ist für diverse zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Motilität und Zelltod von großer Bedeutung [178]. Erk1/2 sind Serin-/Threoninkinasen, welche

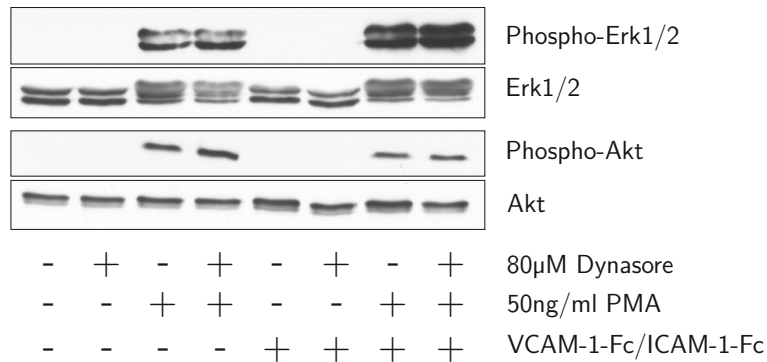


Abbildung 3.16: **Die Aktivierung von Erk1/2 und Akt ist nicht vermindert in Dynasore-behandelten humanen CD4⁺ T-Zellen.** Analyse der Aktivierung von Erk1/2 sowie Akt in primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch die Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert und/oder auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc ausgesät. Die Zellen wurden 15 min nach der Stimulation lysiert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Aktivierung der untersuchten Kinasen wurde mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper beurteilt (Erk1: Threonin202/Tyrosin204; Erk2: Threonin185/Tyrosin187; Akt: Serin473). Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

durch die Phosphorylierung an Threonin202/Tyrosin204 (Erk1) beziehungsweise Threonin185/Tyrosin187 (Erk2) aktiviert werden. Diese Aktivierung wurde mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper in einer Western-Blot-Analyse untersucht, wobei das eingesetzte Zelllysate aus primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen gewonnen wurde, welche zuvor entweder auf unbeschichtetem Plastik oder einer ICAM-1-Fc/VCAM-1-Fc-beschichteten Oberfläche ausgesät und mit PMA stimuliert worden waren. Interessanterweise hatte die chemische Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität durch Dynasore keinen Einfluss auf die Aktivierung von Erk1/2, weder auf die reine Stimulation durch PMA oder den zusätzlichen aktivierenden Effekt durch die angebotenen Integrin-Liganden (Abbildung 3.16). Auch die PMA-stimulierte Aktivierung von Akt (ebenfalls bekannt als Proteinkinase B), einer weiteren wichtigen Serin-/Threoninkinase, welche unter anderem eine kritische Rolle in der Regulation von zellulärem Überleben und Apoptose spielt und durch die Phosphorylierung an Serin473 aktiviert wird [179], konnte durch die Zugabe von Dynasore nicht beeinträchtigt werden (Abbildung 3.16). Dies spricht gegen ein generelles Problem bei Signaltransduktions-Prozessen in Dynasore-behandelten Zellen.

3.9 Dynamin2 reguliert die Chemokin-induzierte Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zellen in ERM-unabhängiger Art und Weise

Wie zuvor erwähnt, konnten während der Analyse des Einflusses von Dynamin2 auf die F-Aktin-Polymerisierung bereits Defekte in der CXCL12-induzierten Polarisierung Aktinhaltiger Strukturen in humanen CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.14 A). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob die Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zellen durch die Inhibition von Dynamin2 generell beeinträchtigt wird. Um dies zu quantifizieren, wurde die Morphologie von DMSO- und Dynasore-behandelten T-Lymphozyten in Suspension mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops und geringer Vergrößerung analysiert. Das führte dazu, dass gewisse Details der Zellmorphologie nicht mehr beurteilt werden konnten, erlaubte aber dennoch eine Differenzierung zwischen einer polarisierten oder unpolarisierten Zellform. Während in Kontrollzellen die relative Anzahl polarisierter Zellen von circa 20 % in unstimulierter Form auf circa 80 % nach der Zugabe des Chemokins CXCL12 anstieg, verloren T-Lymphozyten nach der chemischen Inhibition von Dynamin2 ihre polare Morphologie gänzlich, in unstimuliertem sowie CXCL12-stimuliertem Zustand (Abbildung 3.17 A).

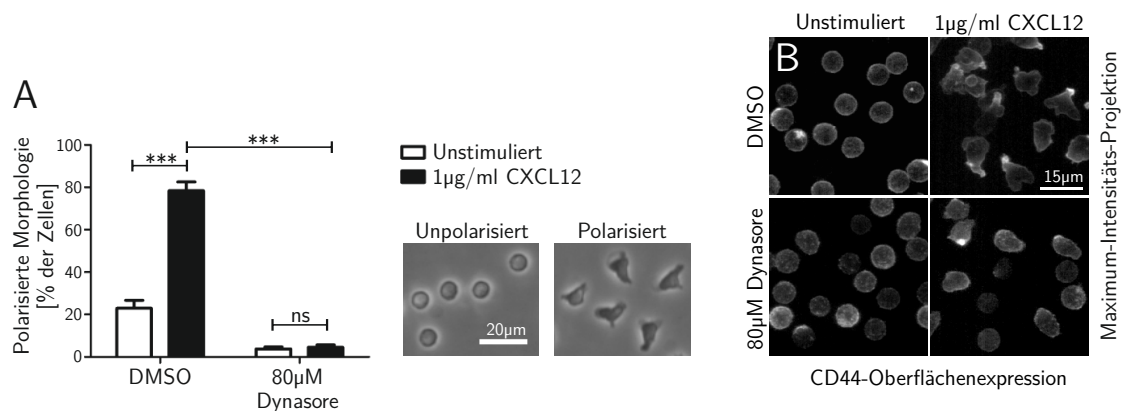


Abbildung 3.17: **Dynamin2 ist wichtig für die Ausbildung einer polarisierten Morphologie in humanen CD4⁺ T-Zellen.** Analyse der Zellpolarisierung in primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen in Suspension. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt, Dynamin2 durch Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 1 µg/ml CXCL12 für 20 min stimuliert. (**A**, n = 3) Analyse des relativen Anteils an T-Zellen mit polarisierter Morphologie. Die Phasenkontrast-Aufnahmen zeigen Beispiele humaner CD4⁺ T-Zellen mit polarisierter beziehungsweise unpolarisierter Morphologie. Pro durchgeführtem Experiment wurden mindestens 500 Zellen ausgewertet. Mittelwert + S.E.M., ***P ≤ 0,001, ns bedeutet nicht signifikant. (**B**) Maximum-Intensitäts-Projektionen von Z-Stapeln (0,3 µm Intervall) aufgenommen mit einem konfokalen LSM. Die Bilder zeigen das Signal einer Immunfluoreszenzmarkierung von Oberflächen-exprimiertem CD44.

Um die zelluläre Polarisierung, wie zuvor bereits im Falle des F-Aktin-Zytoskeletts geschehen, anhand molekularer Marker zu beurteilen, wurde zudem eine Immunfärbung gegen Oberflächen-exprimiertes CD44 auf ruhenden CD4⁺ T-Zellen durchgeführt und mit Hilfe eines konfokalen LSMs analysiert. CD44, ein Glykoprotein, welches unter anderem Hyaluronsäure bindet und so Zellkontakte zur extrazellulären Matrix herstellen kann, ist in polarisierten T-Zellen bevorzugt am Hinterende, also im Uropod zu finden. In DMSO-behandelten Kontrollzellen konnte in der Tat eine Verschiebung des CD44-Signals von einer uniformen Oberflächenverteilung im unstimulierten Zustand hin zu einer Anreicherung im Uropod beobachtet werden (Abbildung 3.17 B). Dynasore-behandelte T-Zellen zeigten hingegen keine starke Verschiebung des CD44-Signals auf der Zelloberfläche, wobei, wie zuvor bereits beobachtet (Abbildung 3.14 A), ein Uropod nicht mehr hinreichend ausgebildet wurde (Abbildung 3.17 B).

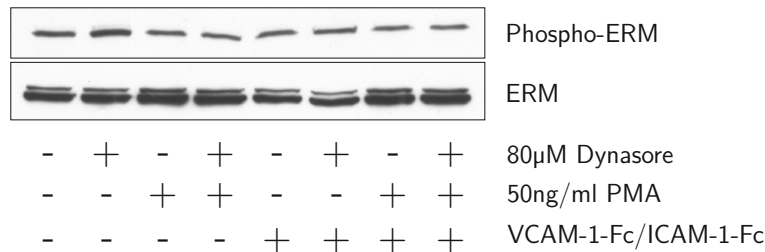


Abbildung 3.18: **Die Inhibition von Dynamin2 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERM in humanen CD4⁺ T-Zellen.** Analyse der Phosphorylierung von Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) in primären ruhenden CD4⁺ T-Zellen. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch die Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert und/oder auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc und VCAM-1-Fc ausgesät. Die Zellen wurden 15 min nach der Stimulation lysiert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Phosphorylierung der untersuchten Kinasen wurde mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper beurteilt (Ezrin: Threonin567; Radixin: Threonin564; Moesin: Threonin 558).

Die Polarisierung von Lymphozyten ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zu diesen Faktoren gehören die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin (zusammengenommen als ERM bezeichnet), welche Linker-Proteine zwischen der Plasmamembran und dem Aktin-Zytoskelett darstellen [180]. ERM-Proteine werden im Rahmen der Polarisierung von T-Zellen de-phosphoryliert [181], ein Prozess, der in Dynamin2-defizienten murinen Thymozyten gestört ist [130]. Da in der vorliegenden Arbeit eine Fehlregulation der Polarisierung Dynasore-behandelter humaner CD4⁺ T-Zellen beobachtet wurde, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der ERM-Phosphorylierungsstatus zwischen Kontroll- und Dynasore-behandelten Lymphozyten unterschiedlich ist. Hierfür wurden primäre ruhende CD4⁺ T-Zellen entweder auf Plastik oder einer ICAM-1-Fc- sowie VCAM-1-Fc-beschichteten Oberfläche ausgesät und teilweise mit PMA stimuliert. Anschließend

wurde eine Western-Blot-Analyse unter Einsatz Phospho-spezifischer Antikörper durchgeführt. Interessanterweise konnte keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von ERM durch die Zugabe von PMA oder die Bereitstellung von Integrin-Liganden beobachtet werden (Abbildung 3.18). Auch die chemische Inhibition von Dynamin2 hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERM, was die Schlussfolgerung zulässt, dass der Polarisierungsphänotyp in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 nicht über eine Fehlregulation von ERM verläuft.

3.10 Dynamin2 ist essentiell für die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1

Rap1 (*Ras-related Protein 1*), eine kleine GTPase aus der Ras-Superfamilie, ist ebenfalls ein bekannter Regulator der Polarisierung von Lymphozyten [182]. Darüber hinaus spielt Rap1 eine wichtige Rolle bei der Integrin-Aktivierung und dadurch auch bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion [33]. Da sowohl die Integrin-vermittelte Adhäsion als auch Polarisierung in humanen T-Zellen ohne Dynamin2-Aktivität beeinträchtigt sind, sollte untersucht werden, ob Rap1 in diesen Zellen effektiv aktiviert wird. Rap1 kann, wie alle kleinen GTPasen, zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand alternieren. Reguliert wird dieser Wechsel über einen kontrollierten Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) und Guanosintriphosphat (GTP). Wenn GDP gebunden ist, befinden sich kleine GTPasen in einem inaktiven Zustand, ein Prozess der durch sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) unterstützt wird. Ist jedoch GTP gebunden, befinden sich kleine GTPasen in einem aktiven Zustand und üben viele verschiedene Funktionen innerhalb der Zellen aus, meist über eine Bindung an sogenannte Effektorproteine. Der Austausch von GDP zu GTP wird dabei durch GTP-Austauschfaktoren (GEFs, *Guanosine triphosphate Exchange Factors*) reguliert, die somit im Zusammenspiel mit GAPs die Aktivität der kleinen GTPase kontrollieren. Die Eigenschaft von Rap1, in aktivem Zustand an GTP gebunden zu sein, wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Aktivität des Proteins zu analysieren. Primäre humane CD4⁺ T-Zellen wurden in Suspension mit PMA stimuliert und anschließend wurde ein biochemischer *Pulldown* des aktivierten Proteins durchgeführt. Dabei wurde die Rap1-bindende Domäne des Effektorproteins RalGDS eingesetzt, welche nur an Rap1-GTP, nicht aber an Rap1-GDP bindet. Diese Domäne wurde an GST fusioniert. Die Aufreinigung erfolgte dementsprechend über eine Glutathion-Matrix. Das Experiment wurde schließlich mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse ausgewertet. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, wirkt sich die chemische Inhibition der GTPase-Aktivität von Dynamin2 durch Dynasore massiv auf die PMA-stimulierte Aktivität von Rap1 aus. Während DMSO-behandelte Kontrollzel-

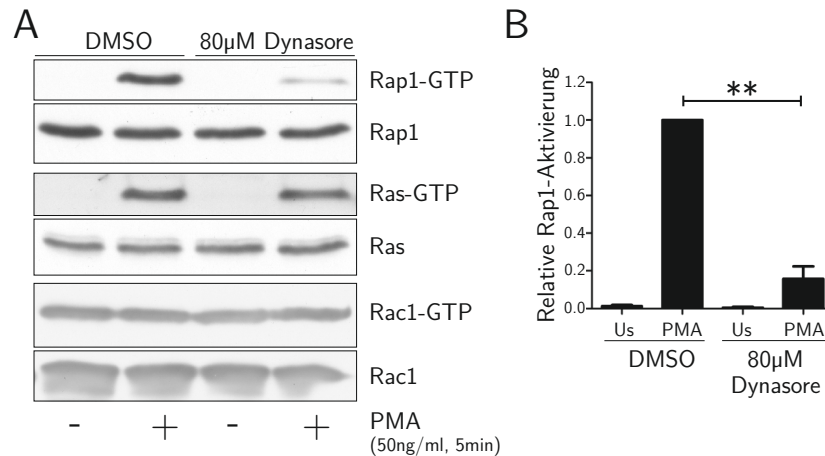


Abbildung 3.19: **Dynamin2 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Rap1, nicht jedoch bei der von Ras und Rac1.** (A) Beispiele von Western-Blot-Analysen biochemischer *Pulldowns* aktivierter GTP-gebundener kleiner GTPasen. Rap1 und Ras wurden über GST-RalGDS-RBD, Rac1 über GST-Pak1-PBD aufgereinigt. Die in die *Pulldowns* eingesetzten Zelllysate wurden aus humanen primären CD4⁺ T-Zellen gewonnen. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch die Zugabe von 80 μM Dynasore inhibiert. Falls angegeben, wurden die Zellen für 5 min mit 50 ng/ml PMA in Suspension stimuliert. (B, n = 3) Quantifizierung der relativen Rap1-Aktivierung basierend auf der Auswertung der Western-Blot-Analysen. Der Wert der PMA-stimulierten DMSO-behandelten Probe wurde auf eins gesetzt. Mittelwert + S.E.M., **P ≤ 0,01, Us bedeutet unstimuliert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

len nach PMA-Stimulation eine starke Aktivierung von Rap1 zeigten, war in Dynasore-behandelten T-Zellen nur eine minimale Aktivierung zu sehen (Abbildung 3.19). Zudem ist es wichtig zu erwähnen, dass dieser Effekt spezifisch für Rap1 war. Die nah verwandte kleine GTPase Ras, welche in ihrer aktiven Form ebenfalls an RalGDS bindet, wurde in ihrer Aktivierung nicht durch die Zugabe von Dynasore beeinträchtigt (Abbildung 3.19 A). Auch Rac1, eine kleine GTPase aus der Superfamilie der Rho-GTPasen, die ebenfalls wichtige Funktionen in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, der Zelladhäsion und der Motilität aufweist, wurde in ihrer Aktivität nicht durch die chemische Inhibition von Dynamin2 beeinflusst (Abbildung 3.19 A).

Um zu bekräftigen, dass Dynamin2 eine essentielle Rolle in der Aktivierung von Rap1 spielt, wurden zusätzlich weitere biochemische *Pulldowns* mit primären humanen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass auch die Zugabe von Dynole 34-2, einem chemisch nicht mit Dynasore verwandten Inhibitor von Dynamin2, eine starke Defizienz in der PMA-stimulierten Aktivierung von Rap1 zur Folge hatte, während das inaktive Dynole 31-2 keinen Einfluss auf diese zeigte (Abbildung 3.20 A, B). Auch die siRNA-vermittelte Herunterregulation der Expression von Dynamin2 störte die PMA-stimulierte Aktivierung von Rap1 in humanen CD4⁺ T-Zellen massiv, wohingegen Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, nach wie vor eine große Menge an

GTP-gebundenem Rap1 nach der Stimulation mit PMA aufwiesen (Abbildung 3.20 C, D).

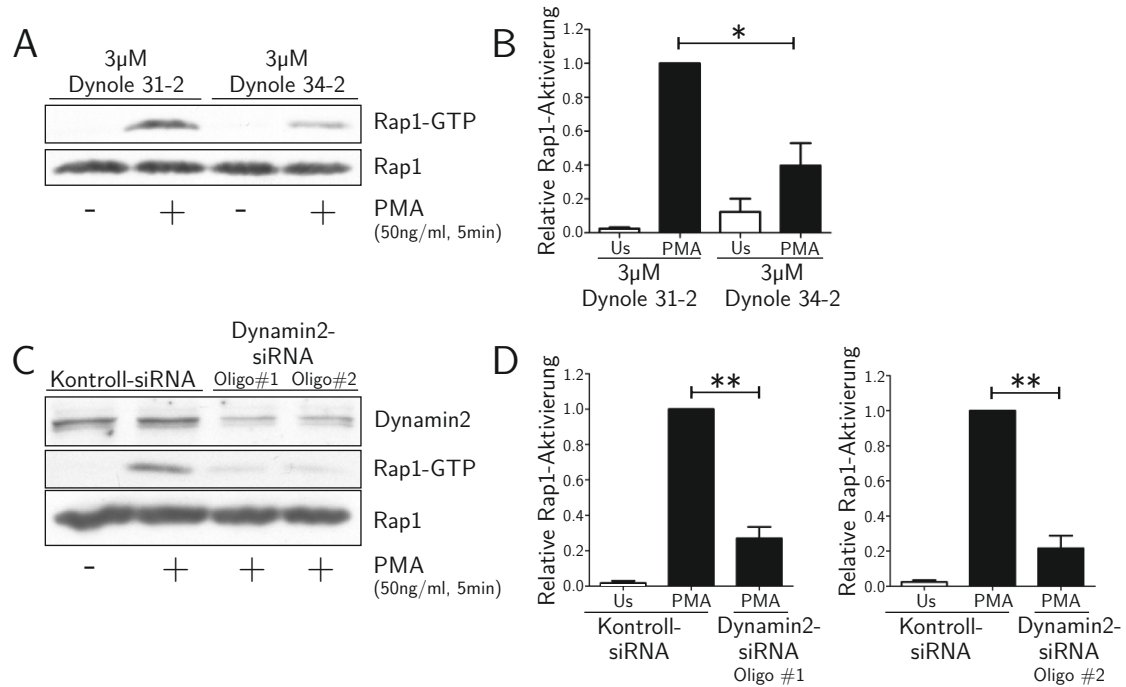


Abbildung 3.20: **Dynamin2 ist essentiell für die PMA-stimulierte Aktivierung von Rap1.** (A, C) Beispiele von Western-Blot-Analysen biochemischer *Pulldowns* von aktiviertem GTP-gebundenem Rap1, welches über GST-RalGDS-RBD aufgereinigt wurde. Die in die *Pulldowns* eingesetzten Zelllysate wurden aus humanen primären CD4⁺ T-Zellen gewonnen. Falls angegeben, wurden die Zellen für 5 min mit 50 ng/ml PMA in Suspension stimuliert. (A, B) Dynamin2 wurde durch Zugabe von 3 μ M Dynole 34-2 inhibiert, Kontrollzellen mit 3 μ M des inaktiven Dynole 31-2 versetzt. (C, D) Die Expression von Dynamin2 wurde durch die Transfektion der Zellen mit zwei unterschiedlich Dynamin2-siRNA Oligos 48 h vor dem Experiment herunterreguliert, Kontrollzellen wurden mit einer inaktiven Kontroll-siRNA transfiziert. (B, D) Quantifizierung der relativen Rap1-Aktivierung basierend auf der Auswertung der Western-Blot-Analysen. Der Wert der PMA-stimulierten Dynole 31-2-behandelten Probe (B, n = 4) beziehungsweise der PMA-stimulierten mit Kontroll-siRNA transfizierten Proben (D, n = 3) wurde auf eins gesetzt. Mittelwert \pm S.E.M., **P \leq 0,01, *P \leq 0,05, Us bedeutet unstimuliert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur die PMA-stimulierte Aktivierung von Rap1 sensitiv gegenüber der Inhibition von Dynamin2 ist. Die kleine GTPase wurde auch durch T-Zell-Rezeptor-abhängige Signalkaskaden aktiviert, welche mit stimulierenden Antikörpern gerichtet gegen CD3 und CD28 induziert wurden, und diese Aktivierung war ebenfalls abhängig von einem funktionellen Dynamin2 (Abbildung 3.21 A). Auch das basal sehr hohe Aktivierungslevel von Rap1 in CD4⁺ Effektor-T-Zellen [183] war sensitiv gegenüber der chemischen Inhibition von Dynamin2 durch Dynasore (Abbildung 3.21 B). Dieser Befund spricht dafür, dass Dynamin2 nicht nur die Rap1-Aktivierung durch externe Stimuli reguliert, sondern ebenfalls eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der

intrinsischen Rap1-Signalgebung einnimmt.

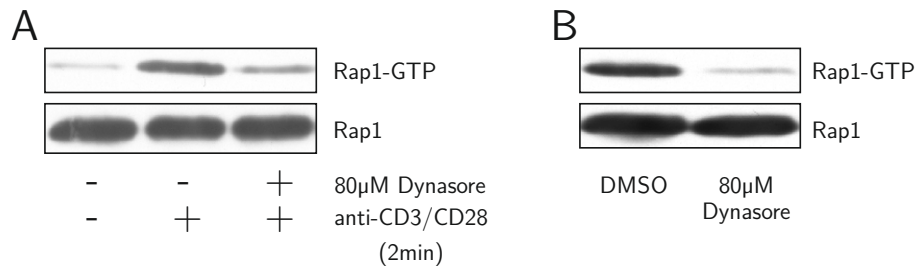


Abbildung 3.21: **Dynamin2 reguliert die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Rap1 und die Aufrechterhaltung der basalen Rap1-Aktivität in Effektor-T-Zellen.** Beispiele von Western-Blot-Analysen biochemischer *Pulldowns* von aktiviertem GTP-gebundenem Rap1, das über GST-RalGDS-RBD aufgereinigt wurde. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 wurde durch die Zugabe von 80 μM Dynasore inhibiert. **(A)** Die in die *Pulldowns* eingesetzten Zelllysate wurden aus ruhenden humanen CD4⁺ T-Zellen gewonnen. Falls angegeben, wurden die Zellen für 2 min in Suspension mit *Dynabeads* stimuliert, welche mit aktivierenden α-CD3- und α-CD28-Antikörpern beschichtet waren (1:1-Verhältnis zu den Zellen). **(B)** Die in die *Pulldowns* eingesetzten Zelllysate wurden aus humanen CD4⁺ Effektor-T-Zellen gewonnen, welche zuvor 72 h mit aktivierenden α-CD3- und α-CD28-Antikörpern stimuliert worden waren. Die Zellen hatten für mehrere Stunden bevor das Experiment durchgeführt wurde keinen Kontakt mehr zu den Antikörpern. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Der Befund, dass Dynamin2 für den Dauerzustand eines basal aktiven Rap1 in CD4⁺ Effektor-T-Zellen von großer Bedeutung ist, erklärt auch, warum diese Zellen ihre unstimuliert relativ starke Adhäsion an Integrin-Liganden durch die Zugabe von Dynasore verlieren (Abbildung 3.4 C, D). Des Weiteren migrieren CD4⁺ Effektor-T-Zellen auch ohne die Zugabe von externen Chemokinen effektiv auf 2-dimensionalen Oberflächen, welche mit Integrin-Liganden beschichtet sind. Diese Integrin-abhängige Migration könnte ebenfalls auf die hohe basale Rap1-Aktivität in Effektor-T-Zellen zurückzuführen sein und wäre somit ebenfalls sensitiv gegenüber der Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität. In der Tat konnte durch Zugabe von Dynasore die basale Motilität humaner CD4⁺ Effektor-T-Zellen auf den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc sowie VCAM-1-Fc massiv herabgesetzt werden (Abbildung 3.22).

Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Rap1 in humanen T-Zellen, welche über kein funktionelles Dynamin2 mehr verfügen, massiv herabgesetzt ist, und da Rap1 als wichtiger Regulator der Zelladhäsion beschrieben wurde, sollte im Folgenden analysiert werden, ob die fehlerhafte Aktivierung von Rap1 auch tatsächlich der Grund für den Adhäsionsdefekt in Dynamin2-defizienten T-Zellen ist. Aus diesem Grund wurden primäre humane CD4⁺ T-Zellen mit verschiedenen Vektor-DNA-Konstrukten transfiziert. Als Kontrolle wurde pEGFP-N1 als Leervektor überexprimiert, was zu einer Expression von eGFP in den Zellen führte. Des Weiteren wurden pEGFP-N1-Rap1a Wildtyp sowie pEGFP-N1-Rap1a G12V in die T-Zellen transfiziert, woraufhin diese ein

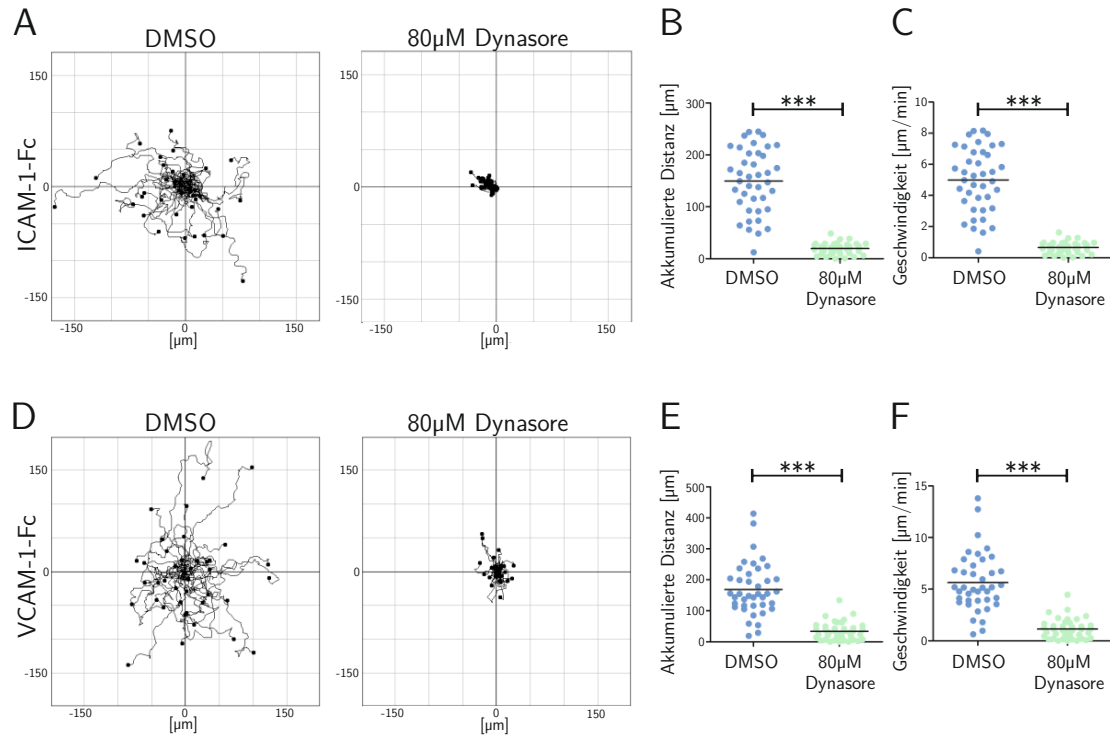


Abbildung 3.22: **Die basale Motilität humaner $CD4^+$ Effektor-T-Zellen auf 2-dimensionalen mit Integrin-Liganden beschichteten Oberflächen ist abhängig von Dynamin2.** Analyse der basalen unstimulierten Migration von humanen $CD4^+$ Effektor-T-Zellen auf 2-dimensionalen mit den Integrin-Liganden ICAM-1-Fc (A-C) und VCAM-1-Fc (D-F) beschichteten Oberflächen. Ruhende primäre $CD4^+$ T-Zellen wurden zuvor 72 h mit aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern stimuliert, hatten jedoch für mehrere Stunden vor dem Experiment keinen Kontakt mehr zu den Antikörpern. Die Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von 30 min analysiert. Angegeben sind die Migrationsspuren (A, D) sowie die Werte für akkumulierte Distanz (B, E) und durchschnittliche Geschwindigkeit einzelner Zellen (C, F). Die Ergebnisse zeigen die Auswertung eines repräsentativen Experimentes von drei verschiedenen unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen. Mittelwert + S.E.M., *** $P \leq 0,001$. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Rap1a-eGFP Wildtyp Fusionsprotein beziehungsweise eine konstitutiv aktive Punktmutante eGFP-Rap1a G12V überexprimierten. Diese Zellen wurden nun entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit Dynasore zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität versetzt und anschließend die statische Adhäsion auf ICAM-1-Fc analysiert. Wie zu erwarten war, konnte eine starke Adhäsion bei DMSO-behandelten Kontrollzellen nach der Stimulation mit PMA beobachtet werden, während ohne PMA-Stimulation auch die Zellen, welche die beiden Rap1a-eGFP Konstrukte überexprimierten, keine starke Adhäsion aufwiesen (Abbildung 3.23 A). Dies spricht dafür, dass eine alleinige Aktivierung von Rap1, wie es im Falle der Zellen, welche die konstitutiv aktive Mutante Rap1a G12V überexprimierten und nicht mit PMA stimuliert wurden zutraf, für eine effiziente Adhäsion von T-Zellen nicht ausreichend ist. Vielmehr scheinen dafür zusätzlich weitere, in

diesem Fall ebenfalls durch PMA stimulierte Prozesse, notwendig zu sein. Dennoch konnte eine geringe Zunahme in der PMA-stimulierten Adhäsion von Rap1a-eGFP Wildtyp sowie G12V überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den eGFP überexprimierenden Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.23 A). Ein anderes Bild bot sich jedoch bei den Dynasore-behandelten Zellen. T-Lymphozyten, welche nur eGFP überexprimierten, waren auch nach PMA-Stimulation nicht in der Lage, auf ICAM-1-Fc zu adhären. Eine Überexpression von Rap1a-eGFP Wildtyp konnte diesen Phänotyp jedoch beseitigen und die Adhäsion auf ein vergleichbares Niveau zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen anheben. Die Überexpression von Rap1a-eGFP G12V führte sogar zu einem circa 3,5-fachen Anstieg der PMA-stimulierten Adhäsion in Dynasore-behandelten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen (Abbildung 3.23 A).

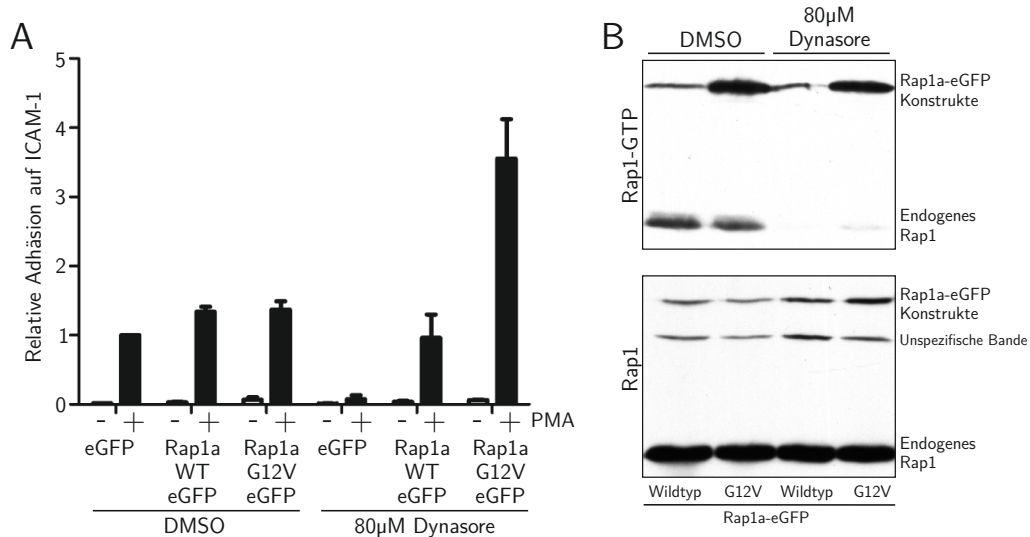


Abbildung 3.23: **Die Überexpression von Rap1a-eGFP-Konstrukten stellt die Adhäsion in Dynasore-behandelten humanen T-Zellen wieder her.** Analyse (A) humaner CD4⁺ T-Zellen oder (B) von Jurkat E6.1 T-Zellen, welche entweder eGFP als Kontrolle oder die Fusionsproteine Rap1a-eGFP Wildtyp beziehungsweise die konstitutiv aktive Punktmutante Rap1a-eGFP G12V überexprimierten. Kontrollzellen wurden mit DMSO versetzt, Dynamin2 durch Zugabe von 80 µM Dynasore inhibiert. (A, n = 2) Analyse der relativen Adhäsion auf ICAM-1-Fc. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PMA stimuliert. Die PMA-stimulierte, DMSO-behandelte und eGFP-überexprimierende Kontrolle wurde auf eins gesetzt. (B) Western-Blot-Analyse eines biochemischen *Pulldowns* von aktiviertem GTP-gebundenem Rap1 (endogen sowie überexprimiert), das über GST-RalGDS-RBD aufgereinigt wurde. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Es stellt sich nun die Frage, warum auch die Überexpression des Rap1a-eGFP Wildtyp-Konstrukts das Adhäsionsdefizit in Dynasore-behandelten Zellen beheben konnte. Um dies zu analysieren, wurde ein biochemischer *Pulldown* von aktiviertem Rap1 in Jurkat E6.1 T-Zellen durchgeführt, welche die entsprechenden Konstrukte überexprimierten. So konnte gezeigt werden, dass endogen exprimiertes Rap1 zwar durch die Zugabe von Dyna-

sore in seiner Aktivität massiv beeinträchtigt wird, überexprimiertes Rap1a-eGFP jedoch sowohl als Wildtyp- als auch als konstitutiv aktives Protein in seiner Aktivität nicht durch Dynasore beeinflusst wurde (Abbildung 3.23 B). Da, vermutlich als Begleiterscheinung der Überexpression, auch ein hohes Level an aktiviertem Rap1a-eGFP Wildtyp vorlag, konnte der Adhäsionsphänotyp Dynasore-behandelter Zellen auch mit diesem Konstrukt, und nicht nur mit der konstitutiv aktiven Mutante, beseitigt werden (Abbildung 3.23 A). Diese Ergebnisse zeigen, dass in humanen CD4⁺ T-Lymphozyten, welche über kein aktives Dynamin2 verfügen, der entsprechend beobachtete Verlust der Integrin-vermittelten Adhäsion auf die defiziente Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 zurückzuführen ist.

3.11 Dynamin2 co-lokalisiert nicht mit Markern für frühe Endosomen und Lysosomen, Tubulin, β_2 -Integrinen oder Talin1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen

Wie bereits beschrieben wurde, konnte überexprimiertes Dynamin2-eGFP in *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran adhärierender beziehungsweise adhärenter Jurkat E6.1 T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.2 B). Da es sich bei den Dynamin2-haltigen Akkumulationen um definierte Strukturen zu handeln scheint, stellt sich die Frage, was für eine Funktion diese in der Zelle haben. Dynamin2 spielt, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle für intrazelluläre Vesikeltransport-Prozesse [80]. Es könnte also sein, dass die beobachteten Akkumulationen von Dynamin2 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen lediglich Punkte mit hoher Endozytose-Aktivität sind. Falls dies zutreffen sollte, wäre zu erwarten, dass Proteine, welche spezifisch auf Membranen des frühen Endosomen-Kompartiments exprimiert werden, mit Dynamin2 in den *Cluster*-ähnlichen Strukturen co-lokalisieren. Die kleine GTPase Rab5A ist ein solcher Marker für frühe Endosomen und reguliert deren Reifung in späte Endosomen [184]. Um zu untersuchen, ob Rab5A und Dynamin2 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen co-lokalisieren, wurden Jurkat E6.1 T-Zellen, welche Dynamin2-eGFP überexprimierten, auf Oberflächen ausgesät, die mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern beschichtet waren, um eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion auszulösen. Während des Adhäsionsprozesses wurden die Zellen fixiert und eine Immunmarkierung mit einem Antikörper gegen Rab5A durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde zudem mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem konfokalen LSM mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert. Interessanterweise konnte so jedoch keine Co-Lokalisation von Rab5A und Dynamin2-eGFP beobachtet werden, da Rab5A nicht in den Dynamin2-angereicherten Akkumulationen

an der Plasmamembran zu finden war, sondern vielmehr an tubulären Strukturen, welche sich von der Peripherie hin zum Mittelpunkt der Zelle zogen (Abbildung 3.24 A).

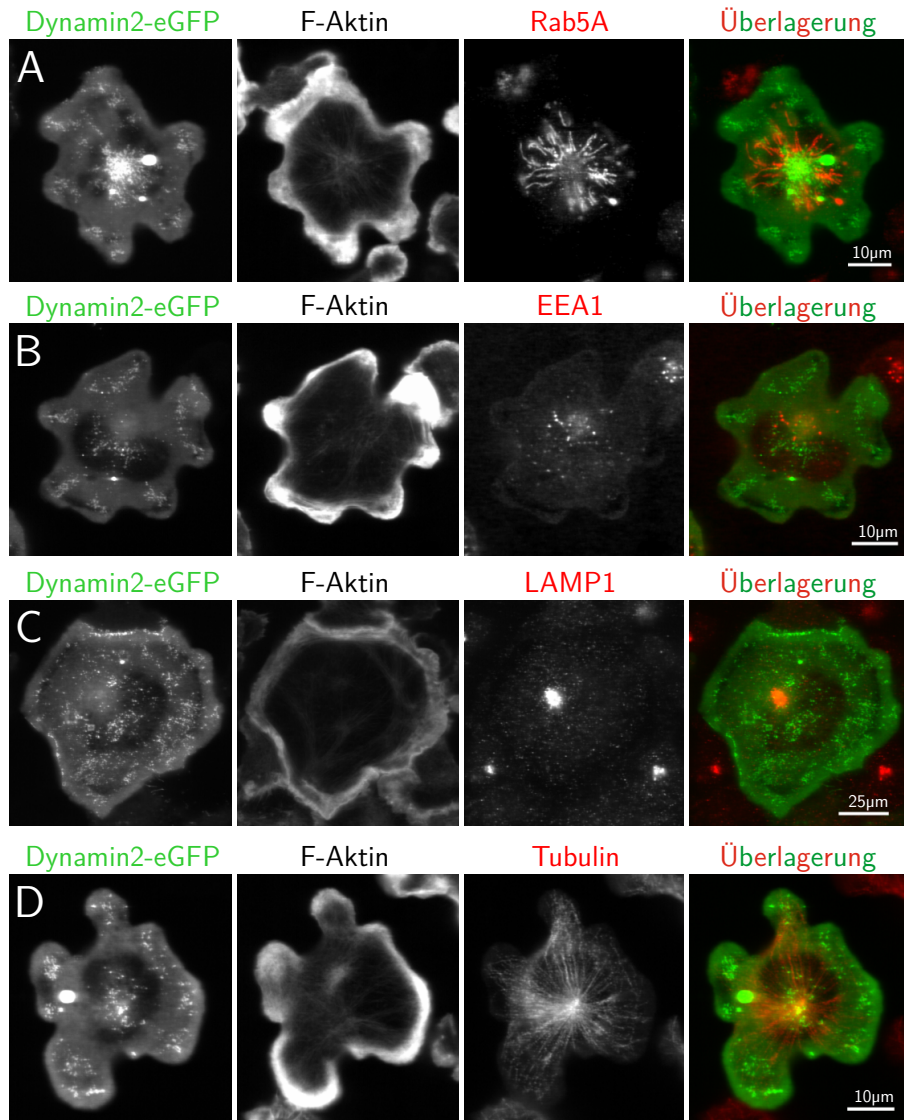


Abbildung 3.24: **Dynamin2-eGFP co-lokalisiert nicht mit Rab5A, EEA1, LAMP1 und Tubulin an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen.** Repräsentative Aufnahmen von Dynamin2-eGFP überexprimierenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten. Die Zellen wurden auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) für 15 min ausgesät und anschließend fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Zudem wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von (A) Rab5A, (B) EEA1, (C) LAMP1 und (D) Tubulin durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen LSMs und mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert.

Auch ein weiterer Marker für frühe Endosomen, EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), ein Protein, das eine wichtige Rolle in der Vesikelfusion spielt [185], konnte nicht in den

Dynamin2-eGFP-haltigen *Cluster*-ähnlichen Strukturen in adhärenenten T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.24 B). Da Dynamin2 auch in die Reifung von Lysosomen impliziert ist [186], wurde ebenfalls eine mögliche Co-Lokalisation von Dynamin2-eGFP mit Lysosomen analysiert. Eine Immunfluoreszenzfärbung des lysosomal exprimierten Proteins LAMP1 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*) veranschaulichte jedoch, dass Dynamin2-eGFP auch nicht mit Lysosomen in adhärenenten T-Zellen co-lokalisierte. Diese waren dagegen sehr punktuell und stark konzentriert auf ein spezifisches Areal innerhalb der Zelle zu finden (Abbildung 3.24 C).

Dynamin wurde ursprünglich als Mikrotubuli-assoziiertes Protein entdeckt [75]. Aus diesem Grund wurde auch die Lokalisation der Mikrotubuli in adhärenenten T-Zellen analysiert, welche jedoch ebenfalls keine starke Co-Lokalisation mit Dynamin2-eGFP zeigten (Abbildung 3.24 D). Die Verteilung des Tubulins ging von einem zentralen Mikrotubuli-organisierenden Zentrum aus in die Peripherie der Zelle, eine ähnliche Verteilung, wie bereits für Rab5A beobachtet. Da bekannt ist, dass Rab5 die Motilität früher Endosomen entlang von Mikrotubuli organisiert [187], ist anzunehmen, dass auch in adhärenenten T-Zellen Rab5A-positive Endosomen an Mikrotubuli gebunden vorliegen (Abbildung 3.24 A, D).

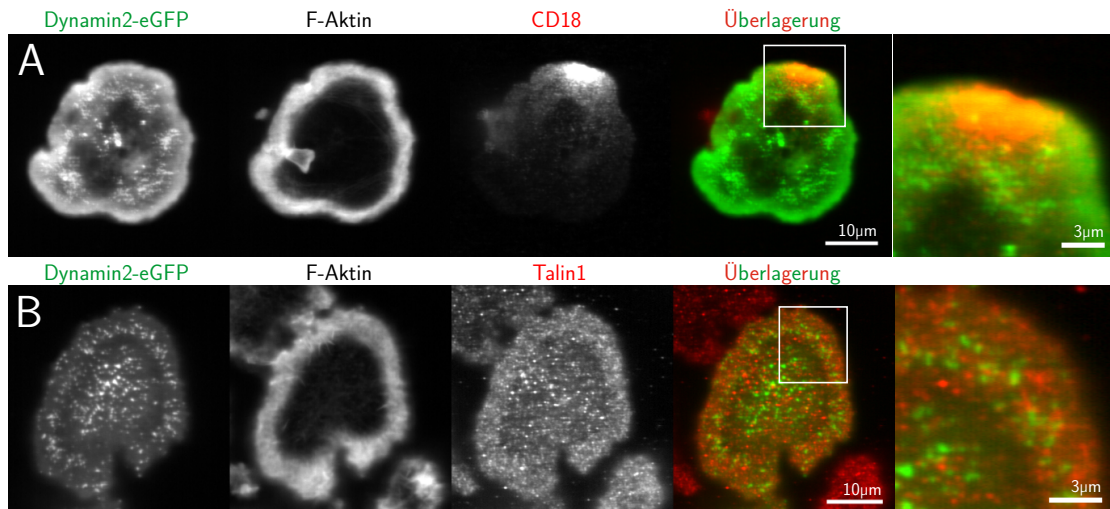


Abbildung 3.25: **Dynamin2-eGFP co-lokalisiert nicht mit CD18 und Talin1 an der basalen Plasmamembran adhärenenten T-Zellen.** Repräsentative Aufnahmen von Dynamin2-eGFP überexprimierenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten. Die Zellen wurden auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) für 15 min ausgesät und anschließend fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Zudem wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von (A) CD18 (β_2 -Integrin) und (B) Talin1 durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen LSMs und mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Die Dynamin2-eGFP-haltigen *Cluster*-ähnlichen Strukturen sind, wie bereits beschrie-

ben, an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen zu finden, also dem Teil der Zelle, welcher die Adhäsion vermittelt. So drängt sich die Frage auf, ob diese *Cluster* eventuell Adhäsionsstrukturen sein könnten. Falls dies der Fall wäre, würde man dort eine Anreicherung von Adhäsionsrezeptoren und deren zugehörigen Adapterproteinen erwarten. Da als Integrin-Ligand ICAM-1-Fc angeboten worden war, wurde eine Immunmarkierung der β_2 -Integrin-Kette (CD18) durchgeführt, welche Teil aller ICAM-1-bindenden Integrine ist. Interessanterweise konnte zwar eine Anhäufung von CD18 in ein großes *Cluster* an der basalen Plasmamembran der Zellen beobachtet werden, jedoch gab es keine auffällige Akkumulation von Dynamin2-eGFP darin. Auch die wesentlich kleineren Anhäufungen von Dynamin2-eGFP wiesen keine Co-Lokalisation mit CD18 auf (Abbildung 3.25 A). Des Weiteren wurde eine Immunmarkierung von Talin1, einem essentiellen Linker-Protein zwischen allen Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett [188], durchgeführt. Doch auch Talin1 zeigte keine spezifische Co-Lokalisation mit den Dynamin2-eGFP *Clustern* an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen (Abbildung 3.25 B). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei den beobachteten Dynamin2-eGFP-haltigen Strukturen nicht um Adhäsionsstrukturen handelt.

3.12 Dynamin2 reguliert die Aktivierung von FAK und Pyk2 und co-lokalisiert mit ihnen sowie mit Kinasen der Src-Familie an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen

Die Tyrosinkinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*) sowie das nah verwandte Protein Pyk2 (*Proline-rich Tyrosine Kinase 2*) sind bekannte Regulatoren von Integrin-Funktionen und T-Zelladhäsion. Ihre Aktivierung basiert auf einer Autophosphorylierung, die durch verschiedene externe Stimuli oder auch intrinsische Signalkaskaden induziert werden kann. Wenn entsprechend autophosphoryliert (FAK an Tyrosin397, Pyk2 an Tyrosin402), interagieren die beiden Tyrosinkinasen mit Mitgliedern der Familie der Src-Kinasen (SFKs, *Src Family Kinases*) durch direkte Bindung an diese, was zu weiteren Phosphorylierungen führt [189]. Zudem wurde bereits beschrieben, dass auch Mitglieder der Dynamin-Familie in diese Komplexe rekrutiert werden können [118]. Um zu analysieren, ob solche Komplexe auch während des Adhäsionsprozesses in humanen T-Zellen gebildet werden, wurden Dynamin2-eGFP überexprimierende Jurkat E6.1 T-Zellen auf Oberflächen ausgesät, die mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern beschichtet waren. Die Zellen wurden während der Adhäsion fixiert und Immunfärbungen mit Phospho-spezifischen Antikörpern gegen FAK, Pyk2 und SFKs durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Die Zellen wurden an-

schließlich mit einem konfokalen LSM analysiert. Dynamin2 akkumulierte auch hier wieder in *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran (Abbildung 3.26). Interessanterweise konnte in diesen Anhäufungen eine sehr starke Co-Lokalisation mit aktivierter, also autophosphorylierter FAK beobachtet werden (Abbildung 3.26 A). Auch Pyk2 und SFKs co-lokalisierten in ihrer aktivierten Form an der basalen Plasmamembran mit Dynamin2 in den *Cluster*-ähnlichen Strukturen, wie Immunfluoreszenzmarkierungen mit Phospho-spezifischen Antikörpern gerichtet gegen diese Proteine zeigten (Abbildung 3.26 B, C).

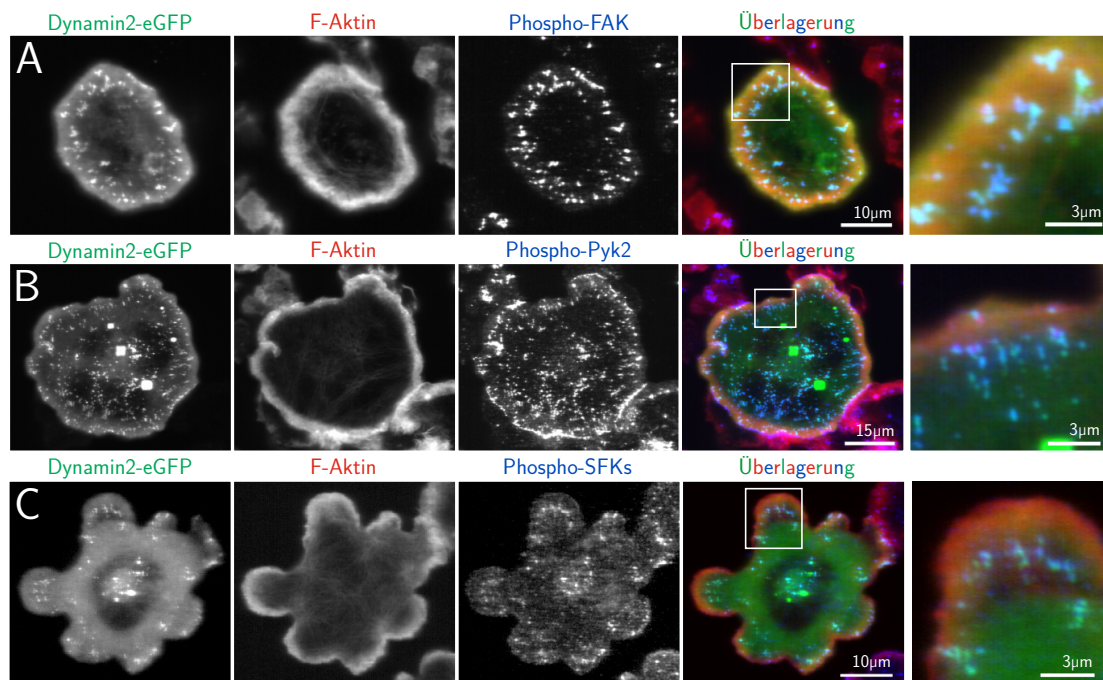


Abbildung 3.26: **Dynamin2-eGFP co-lokalisiert mit FAK, Pyk2 und SFKs in ihrem aktivierten Zustand an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen.** Repräsentative Aufnahmen von Dynamin2-eGFP überexprimierenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten. Die Zellen wurden auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) für 15 min ausgesät und anschließend fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Zudem wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper von (A) Phospho-FAK (Tyrosin397), (B) Phospho-Pyk2 (Tyrosin402) oder (C) Phospho-SFKs (*Src Family Kinases*, Tyrosin416 oder äquivalent) durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen LSMs und mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Eine so starke Co-Lokalisation, wie sie im Falle von Dynamin2 und den oben genannten Tyrosinkinase zu finden ist, könnte ein Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen sein. So stellt sich die Frage, ob Dynamin2 einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von FAK und Pyk2 in T-Lymphozyten haben könnte. Um

dies zu untersuchen, wurden primäre humane CD4⁺ T-Zellen sowie Jurkat E6.1 T-Zellen auf entweder unbeschichteten, mit ICAM-1-Fc-beschichteten oder mit ICAM-1-Fc- und α -CD3-/ α -CD28-Antikörpern-beschichteten Oberflächen ausgesät, dort für 15 min inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse die Phosphorylierung von FAK und Pyk2 überprüft. In DMSO-behandelten Kontrollzellen führte die Inkubation auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie α -CD3- und α -CD28-Antikörpern zu einer starken Aktivierung von FAK und Pyk2, welche durch deren Autophosphorylierung an den Tyrosinen an Position 397 (FAK) beziehungsweise 402 (Pyk2) deutlich wurde (Abbildung 3.27). Eine alleinige Inkubation der Zellen auf ICAM-1-Fc hatte dabei nur einen minimalen bis keinen Effekt. Wurde aber nun die Dynamin2 GTPase-Aktivität durch die Zugabe von Dynasore inhibiert, wurde in den T-Zellen weder FAK noch Pyk2 effizient phosphoryliert, was eindeutig für eine Rolle von Dynamin2 bei der Aktivierung dieser wichtigen Tyrosinkinasen spricht (Abbildung 3.27).

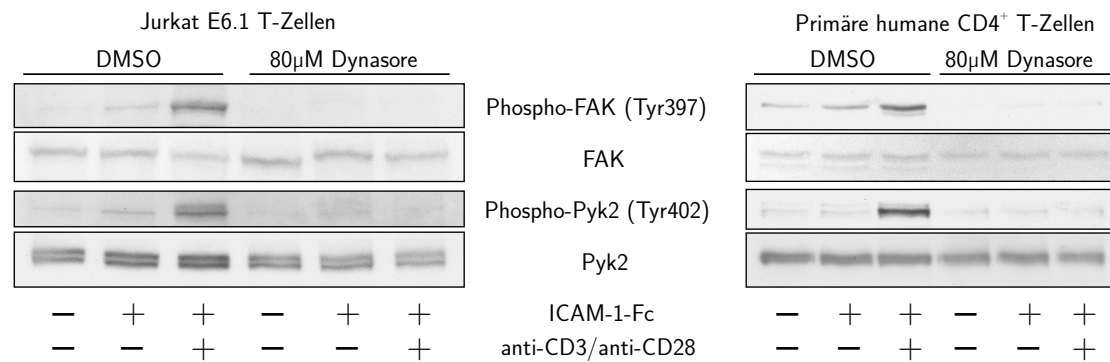


Abbildung 3.27: **Dynamin2 reguliert die Aktivierung von FAK und Pyk2.** Analyse der Aktivierung von FAK und Pyk2 in Jurkat E6.1 T-Zellen sowie primären humanen CD4⁺ T-Zellen welche jeweils entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 µM Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 behandelt wurden. Die Lymphozyten wurden entweder auf unbeschichteten, auf mit ICAM-1-Fc-beschichteten oder auf mit ICAM-1-Fc- und α -CD3-/ α -CD28-Antikörpern-beschichteten Oberflächen ausgesät und dort für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungsstatus von FAK und Pyk2 mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.13 Dynamin2 co-lokalisiert mit RapGEF1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen und reguliert dessen Phosphorylierung

Da in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt wurde, dass Dynamin2 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 spielt, stellte sich die Frage, ob Dynamin2 und Rap1 direkt miteinander interagieren. Um dies zu untersuchen, wurde mit

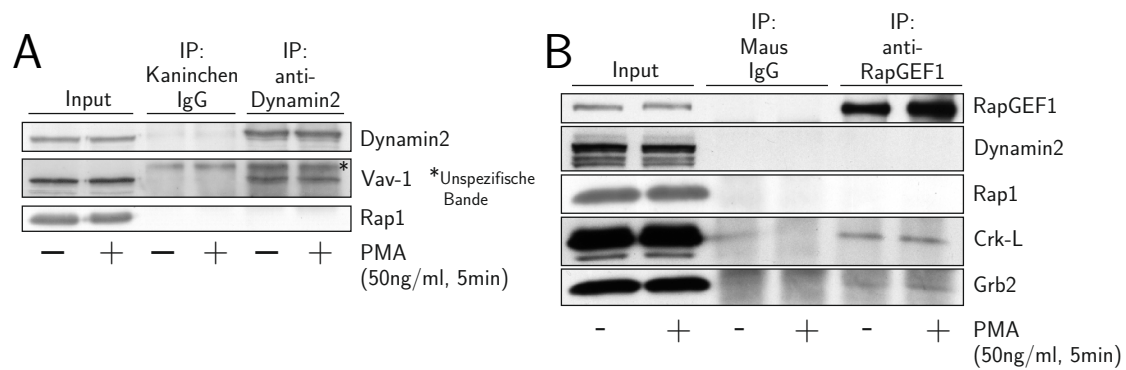


Abbildung 3.28: **Es gibt keine nachweisbare direkte Interaktion zwischen Dynamin2 und Rap1 beziehungsweise RapGEF1.** Western-Blot-Analysen von Co-Immunpräzipitationen (Co-IPs) in primären humanen CD4⁺ T-Zellen. Für die Co-IPs wurden entweder **(A)** α -Dynamin2 oder **(B)** α -RapGEF1-Antikörper und ihre jeweiligen Isotyp-Kontrollen verwendet, wobei die Antikörper zuvor auf Protein G-gekoppelten *Dynabeads* immobilisiert worden waren. Falls angegeben, wurden die Zellen für 5 min mit 50 ng/ml PMA stimuliert. Kontrollzellen wurden mit DMSO inkubiert, Dynamin2 wurde durch Zugabe von 80 μ M Dynasore inhibiert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Zelllysaten von primären humanen CD4⁺ T-Zellen eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt, eine Methode, die dem Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktionen dient. Interessanterweise konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen Rap1 und Dynamin2 nachgewiesen werden, weder in unstimulierten noch in PMA-stimulierten T-Zellen (Abbildung 3.28 A). Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine direkte Interaktion zwischen Dynamin2 und Vav1 beobachtet werden (Abbildung 3.28 A), welche bereits beschrieben wurde und als Positiv-Kontrolle für die Co-IP diente [113]. Mit einer weiteren Co-IP wurden zudem direkte Interaktionen mit RapGEF1 (auch bekannt als C3G), einem wichtigen GEF für Rap1 [60], untersucht. Jedoch konnte auch hier keine direkte Bindung von RapGEF1 an Dynamin2 oder Rap1 beobachtet werden (Abbildung 3.28 B). Die Adapter-Proteine Crk-L sowie Grb2, beides bekannte Interaktoren von RapGEF1 [190], konnten jedoch mit der IP von RapGEF1 aus den Zelllysaten depletiert werden (Abbildung 3.28 B).

Da ein Negativ-Ergebnis einer Co-IP noch keine endgültige Aussage darüber zulässt, ob Proteine wirklich nicht miteinander interagieren, und da es auch die Möglichkeit indirekter Interaktionen von Proteinen in multimeren Komplexen gibt, wurde neben der Co-IP auch noch die Möglichkeit einer Co-Lokalisation von Dynamin2 mit Rap1 sowie mit RapGEF1 mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden, wie bereits beschrieben, Dynamin2-eGFP überexprimierende Jurkat E6.1 T-Zellen auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden Antikörpern gerichtet gegen CD3 und CD28 ausgesät, für 15 min inkubiert und anschließend fixiert. Im Falle von Rap1 wurde zusätzlich zu Dynamin2-eGFP auch noch ein Rap1a-RFP-Konstrukt überexprimiert, die

Co-Lokalisation zwischen Dynamin2 und RapGEF1 wurde mittels einer Immunfluoreszenzmarkierung analysiert. Die Auswertung erfolgte schließlich mit einem konfokalen LSM. Doch auch mit dieser Methode konnte keine Co-Lokalisation von Dynamin2-eGFP und Rap1a-RFP beobachtet werden, was, zusammengenommen mit den Ergebnissen der Co-IP, eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen sehr unwahrscheinlich macht (Abbildung 3.29 A). Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine Anreicherung von RapGEF1 in den Dynamin2-haltigen *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran beobachtet werden (Abbildung 3.29 B). Wichtig zu erwähnen ist, dass für die Immunmarkierung von RapGEF1 ein Phospho-spezifischer Antikörper benutzt wurde, der nur phosphoryliertes RapGEF1 (Tyrosin504) erkennt. Diese Phosphorylierung an RapGEF1 wird durch Kinasen der Src-Familie, welche in ihrer aktivierten Form ebenfalls in den Dynamin2-haltigen Komplexen zu finden waren (Abbildung 3.26 C), vermittelt [59]. Zudem wird die GEF-Aktivität von RapGEF1 für Rap1 durch die Phosphorylierung an Tyrosin504 massiv erhöht [58].

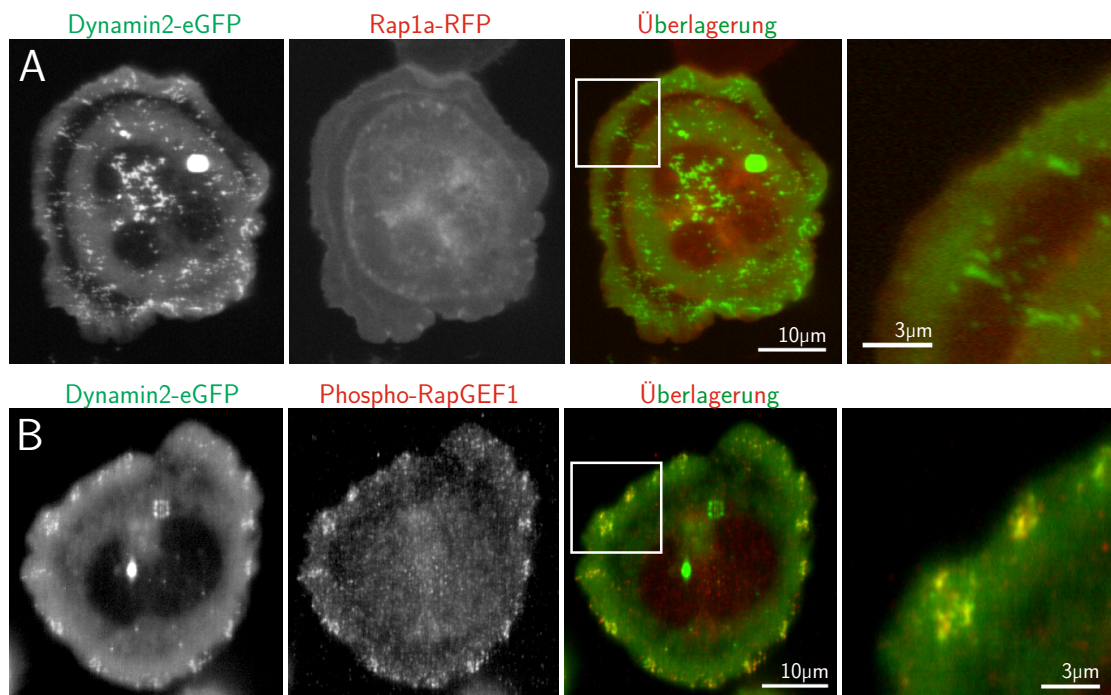


Abbildung 3.29: Dynamin2-eGFP co-lokalisiert nicht mit Rap1a-RFP, jedoch mit phosphoryliertem RapGEF1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen. Repräsentative Aufnahmen von Dynamin2-eGFP überexprimierenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten. Die Zellen wurden auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) für 15 min ausgesät und anschließend fixiert. Zudem wurde (A) ein Rap1a-RFP-Konstrukt überexprimiert beziehungsweise (B) eine Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe eines Phospho-spezifischen Antikörpers gegen Phospho-RapGEF1 (Tyrosin504) durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen LSMs und mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Da eine Co-Lokalisation von Dynamin2 mit aktivierten SFKs und aktiviertem RapGEF1 an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob Dynamin2 die SFK-vermittelte Aktivierung von RapGEF1 kontrollieren könnte. Um dies zu überprüfen, wurden primäre humane CD4⁺ T-Zellen auf entweder unbeschichteten, mit ICAM-1-Fc-beschichteten oder mit ICAM-1-Fc- und α -CD3-/ α -CD28-Antikörpern-beschichteten Oberflächen ausgesät, dort für 15 min inkubiert und schließlich mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse die Phosphorylierung von RapGEF1 an Tyrosin504 überprüft. Tatsächlich wurde ein massiver Phosphorylierungs-Defekt von RapGEF1 an Tyrosin504 in Dynasore-behandelten T-Zellen beobachtet, während mit DMSO inkubierte Kontrollzellen nach der Stimulation mit aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern eine starke Phosphorylierung von RapGEF1 aufwiesen (Abbildung 3.30). Dieses Ergebnis zeigt, dass funktionelles Dynamin2 eine wichtige Rolle bei der SFK-vermittelten Aktivierung von RapGEF1 spielt.

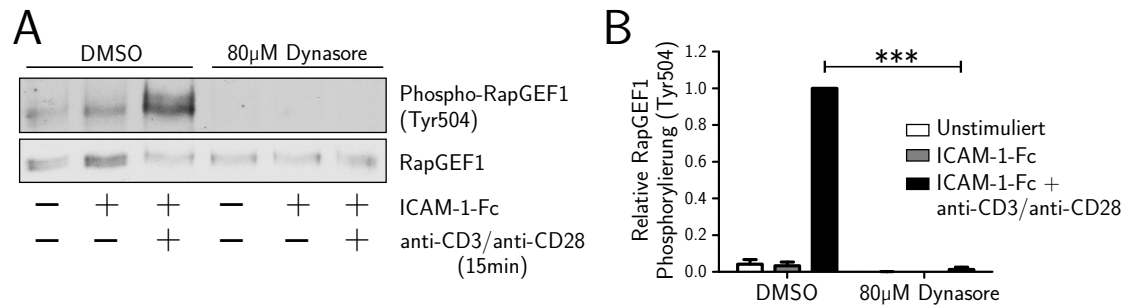


Abbildung 3.30: **Dynamin2 reguliert die Aktivierung von RapGEF1.** Analyse der Aktivierung von RapGEF1 in primären humanen CD4⁺ T-Zellen welche entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 µM Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 behandelt wurden. Die Lymphozyten wurden entweder auf unbeschichteten, auf mit ICAM-1-Fc-beschichteten oder auf mit ICAM-1-Fc- und α -CD3-/ α -CD28-Antikörpern-beschichteten Oberflächen ausgesät und dort für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungsstatus von RapGEF1 mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. **(A)** Repräsentative Western-Blot-Analyse der Phosphorylierung von RapGEF1. **(B, n = 4)** Quantifizierung der relativen RapGEF1-Aktivierung basierend auf der Auswertung der Western-Blot-Analysen. Der Wert der α -CD3-/ α -CD28/ICAM-1-Fc-stimulierten DMSO-behandelten Probe wurde auf eins gesetzt. Mittelwert + S.E.M., ***P ≤ 0,001. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.14 Dynamin2 durchläuft eine dynamische Umverteilung an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dynamin2 in adhärenen T-Zellen in *Cluster*-ähnliche Strukturen an der peripheren basalen Plasmamembran lokalisiert, welche weder Marker für Vesikeltransport noch für Adhäsionsstrukturen beinhalten.

Vielmehr konnte in diesen *Clustern* eine Ansammlung von aktivierten Signaltransduktoren gefunden werden (SFKs, FAK, Pyk2 und RapGEF1), die wichtige Funktionen bei der Vermittlung der Integrin-abhängigen Zelladhäsion sowie Rap1-Aktivierung haben. Die Aktivierung dieser Faktoren (FAK, Pyk2 und RapGEF1) war zudem abhängig von der Anwesenheit eines funktionellen Dynamin2. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beobachteten *Cluster*-ähnlichen Strukturen als Plattformen dienen könnten, in welchen entsprechende Signalkaskaden gesteuert werden. Da durch die Inhibition von Dynamin2 die Aktivierung der Signaltransduktoren blockiert wurde, stellt sich demnach die Frage, ob die Inhibition von Dynamin2 auch einen Einfluss auf die Dynamik der Dynamin2-haltigen *Cluster*-ähnlichen Strukturen haben könnte. Weil die Formation dieser Strukturen nicht in Zellen untersucht werden konnte, welche schon vor dem Ausplattieren mit einem Dynamin2-Inhibitor behandelt wurden, bedingt durch deren extrem starke Adhäsionsdefizienz (Abbildung 3.3), wurde die Dynamik bereits geformter *Cluster* in zuvor adhärenz T-Zellen analysiert. Dafür wurden Dynamin2-eGFP überexprimierende Jurkat E6.1 T-Zellen auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern ausgesät, für 15 min inkubiert und dann mit entweder DMSO als Kontrolle oder mit Dynasore zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität versetzt. Anschließend wurde mittels FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) die Dynamik der Dynamin2-eGFP-haltigen peripheren *Cluster* analysiert. FRAP beruht auf dem gezielten Ausbleichen spezifischer Fluoreszenzsignale, in diesem Fall dem von Dynamin2-eGFP, und einer anschließenden Analyse der Wiederherstellung der Fluoreszenz in diesem Bereich. Dabei können unter anderem Rückschlüsse auf die Mobilität des Moleküls von Interesse gezogen werden.

Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, konnte die Fluoreszenz des Dynamin2-Signals in den *Cluster*-ähnlichen Strukturen DMSO-behandelter T-Zellen auf einen Wert von durchschnittlich über 80 % des Ausgangswertes wiederhergestellt werden, wobei ein Plateau zwischen 10 s und 20 s nach dem Ausbleichen erreicht wurde. Ähnlich schnell wurde das Plateau der maximalen Regeneration der Fluoreszenz in Dynasore-behandelten T-Zellen erreicht, jedoch pendelte sich dies bei nur circa 40 % der Ausgangsfluoreszenz ein (Abbildung 3.31). Dieses Ergebnis belegt die Wichtigkeit der GTPase-Aktivität von Dynamin2 für dessen Mobilität, welche direkten Einfluss auf die Dynamik des Proteins innerhalb der Signaltransduktionsplattformen an der basalen Plasmamembran adhärenz T-Zellen hat.

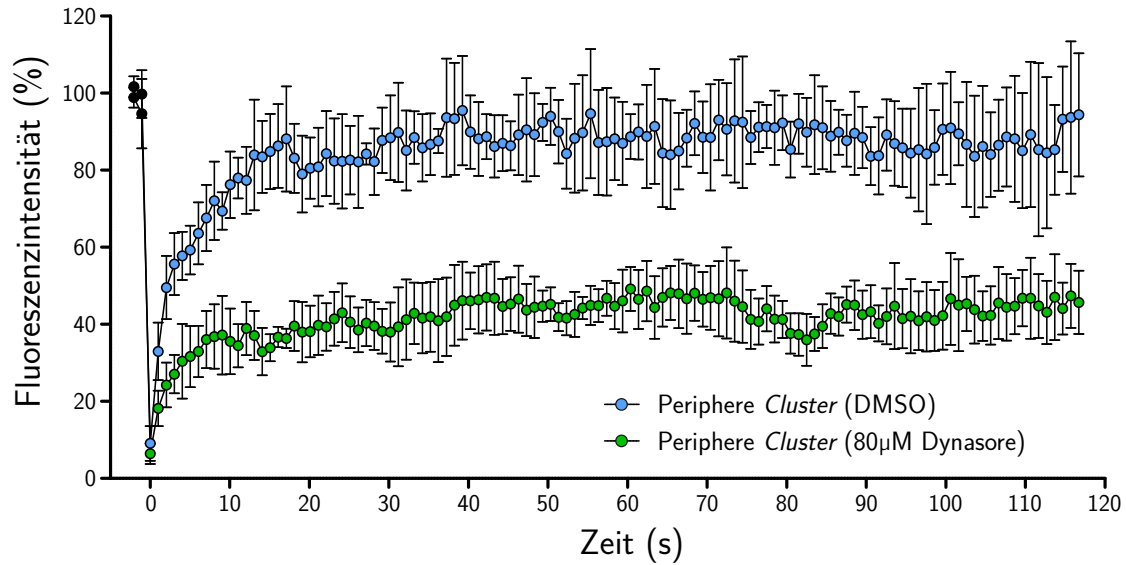


Abbildung 3.31: **Die Mobilität von Dynamin2-eGFP in *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der peripheren basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen ist abhängig von dessen GTPase-Aktivität.** FRAP-Analyse (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) von Dynamin2-eGFP in *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen. Dynamin2-eGFP überexprimierende Jurkat E6.1 T-Zellen wurden zuvor auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) ausgesät und für 15 min adhären gelassen. Daraufhin wurde den Zellen entweder DMSO als Kontrolle oder 80 μ M Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 zugegeben. Anschließend wurde eine FRAP-Analyse mit Hilfe eines konfokalen LSMs durchgeführt. Die Bildaufnahmen erfolgten mit 1 Hz für 120 s, wobei nach 3 s das Areal von Interesse gebleicht wurde. Schließlich wurde die Fluoreszenzintensität für die jeweiligen Messzeitpunkte prozentual zum durchschnittlichen Ausgangswert bestimmt und graphisch dargestellt. Mittelwert + S.D., n = 5 (DMSO), n = 6 (Dynasore).

Während die beobachteten Dynamin2-haltigen *Cluster*-ähnlichen Plattformen an der basalen Plasmamembran von T-Zellen, welche sich gerade im Adhäsionsprozess befinden (aufgenommen immer 15 min nach dem Ausplattieren der Zellen), stets in großer Zahl auftraten und auf der gesamten Fläche der basalen Plasmamembran zu finden waren, meist jedoch in deren Peripherie lagen, konnte mit fortschreitender Zeit von Adhäsion und Stimulation der Zellen eine Zentralisierung des Dynamin2-eGFP-Signals beobachtet werden (Abbildung 3.32). Um dies genauer zu untersuchen, wurden Jurkat E6.1 T-Zellen mit einem Dynamin2-eGFP- sowie einem Lifeact-RFP-Konstrukt transfiziert und schließlich auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern ausgesät. Durch die Aufnahme von Zeitserien mit anschließender Erstellung von Kymographen (Zeit-Raum-Grafiken) konnte gezeigt werden, dass neben einem retrograden Aktinfluss (markiert durch Lifeact-RFP) von der Peripherie ins Zentrum an der basalen Plasmamembran auch das Dynamin2-eGFP-Signal zentralisiert wurde (Abbildung 3.32 A, B).

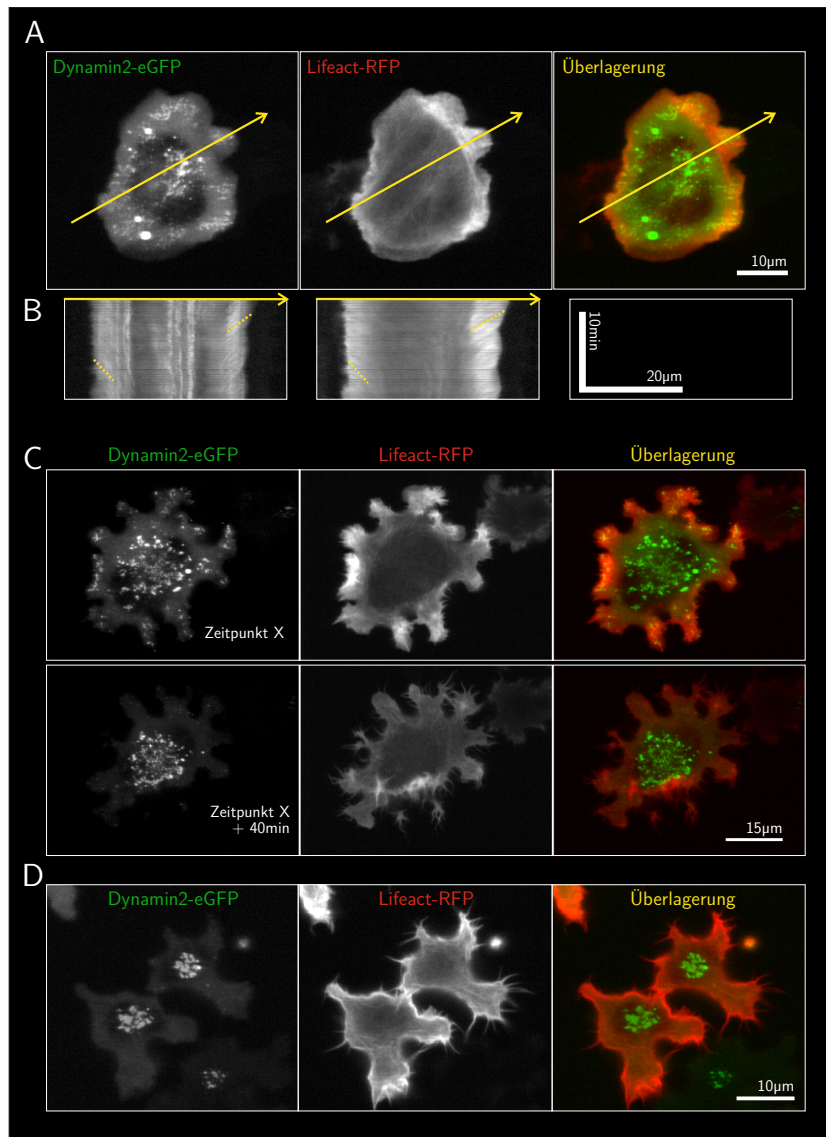


Abbildung 3.32: **Dynamin2-eGFP relokalisiert sich im Laufe der T-Zelladhäsion von kleinen peripheren Akkumulationen in ein großes zentrales Cluster.** Analyse der Lokalisation von Dynamin2-eGFP und des F-Aktin-Zytoskeletts (markiert durch Lifeact-RFP) in lebenden adhärenen Jurkat E6.1 T-Zellen mit Hilfe konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie über die Zeit. Die Zellen sind adhären auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc und aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml). Der Fokus liegt auf der basalen Plasmamembran. (A) T-Zelle 15 min nachdem sie auf der Oberfläche ausgesät wurde. Die Zelle wurde über 12 min analysiert, indem alle 5 s ein Bild aufgenommen wurde. (B) Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden Kymographen erstellt, welche die Signale, die auf den gelben Linien liegen, über die Zeit darstellen. Es ist deutlich ein retrograder Fluss des Dynamin2-eGFP- und Lifeact-RFP-Signals über die Zeit von der Peripherie in das Zentrum der basalen Plasmamembran zu beobachten. (C) T-Zelle circa 90 min nachdem sie auf der Oberfläche ausplattiert wurde sowie weitere 40 min später. Eine deutliche Zentralisierung des Dynamin2-eGFP-Signals ist zu beobachten. (D) T-Zellen circa 4 h nach der initialen Adhäsion. Dynamin2-eGFP wurde komplett in zentrale Cluster relokalisiert, die Zellen haben sich morphologisch stark zusammengezogen.

Beobachtete man zudem die Zellen über einen längeren Zeitraum, konnte man den Verlust der Dynamin2-eGFP-*Cluster* in der Peripherie beobachten, während das Dynamin2-eGFP-Signal im Zentrum der Zellen stark zunahm (Abbildung 3.32 B). Dies ging auch mit einer Formveränderung der Zellen einher. Während innerhalb der ersten Stunde der Adhärenz die Zellen stark ausgebreitet waren und Lamellipodien in alle Richtungen ausbildeten (Spiegelei-Form), zogen sich die Zellen mit der Zeit wieder zusammen, ein Prozess der mit der Zentralisierung von Dynamin2 einherging (Abbildung 3.32, 3.33 A). Schließlich wurde Dynamin2-eGFP in den meisten Zellen, wenn sie über einen entsprechend langen Zeitraum adhärent waren (circa 3-4 h), komplett in ein massives zentrales *Cluster* zusammengezogen (Abbildung 3.32 D).

Verglichen mit den am Anfang des Adhäsionsprozesses geformten Dynamin2-haltigen *Cluster*-ähnlichen Signalkomplexen in der Peripherie der basalen Plasmamembran wiesen die großen zentralen Dynamin2-*Cluster*, welche erst später geformt wurden, eine wesentlich geringere Dynamik von Dynamin2-eGFP auf, wie anhand von weiteren FRAP-Analysen beobachtet werden konnte. Während die Rückgewinnung des Dynamin2-eGFP-Signals in den gebleichten Arealen innerhalb der peripheren *Cluster* bei, wie bereits beschrieben, circa 80 % lag, pendelte sich diese in den zentralen *Clustern* bei gerade einmal 20 % ein, was dafür spricht, dass Dynamin2 zu diesem Zeitpunkt der T-Zelladhäsion beziehungsweise -aktivierung wesentlich weniger mobil ist als zum Beginn dieser Prozesse (Abbildung 3.33 B).

Es stellt sich nun die Frage, ob die Funktion der zentralen Dynamin2-haltigen *Cluster* an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen, welche sich erst Stunden nach deren Aktivierung formen, die gleichen Funktionen haben wie die weitaus dynamischeren Dynamin2-Akkumulationen, welche sich zu Beginn der T-Zelladhäsion primär in der Peripherie der basalen Plasmamembran bilden. Den peripheren *Cluster*-ähnlichen Strukturen wurde eine wichtige Funktion in der Zelladhäsions-stimulierenden Signaltransduktion zugeordnet und es konnten die wichtigen Signalproteine FAK, Pyk2 und RapGEF1 in ihrem aktiven Zustand dort nachgewiesen werden, wobei dieser aktive Zustand von Dynamin2 reguliert wurde.

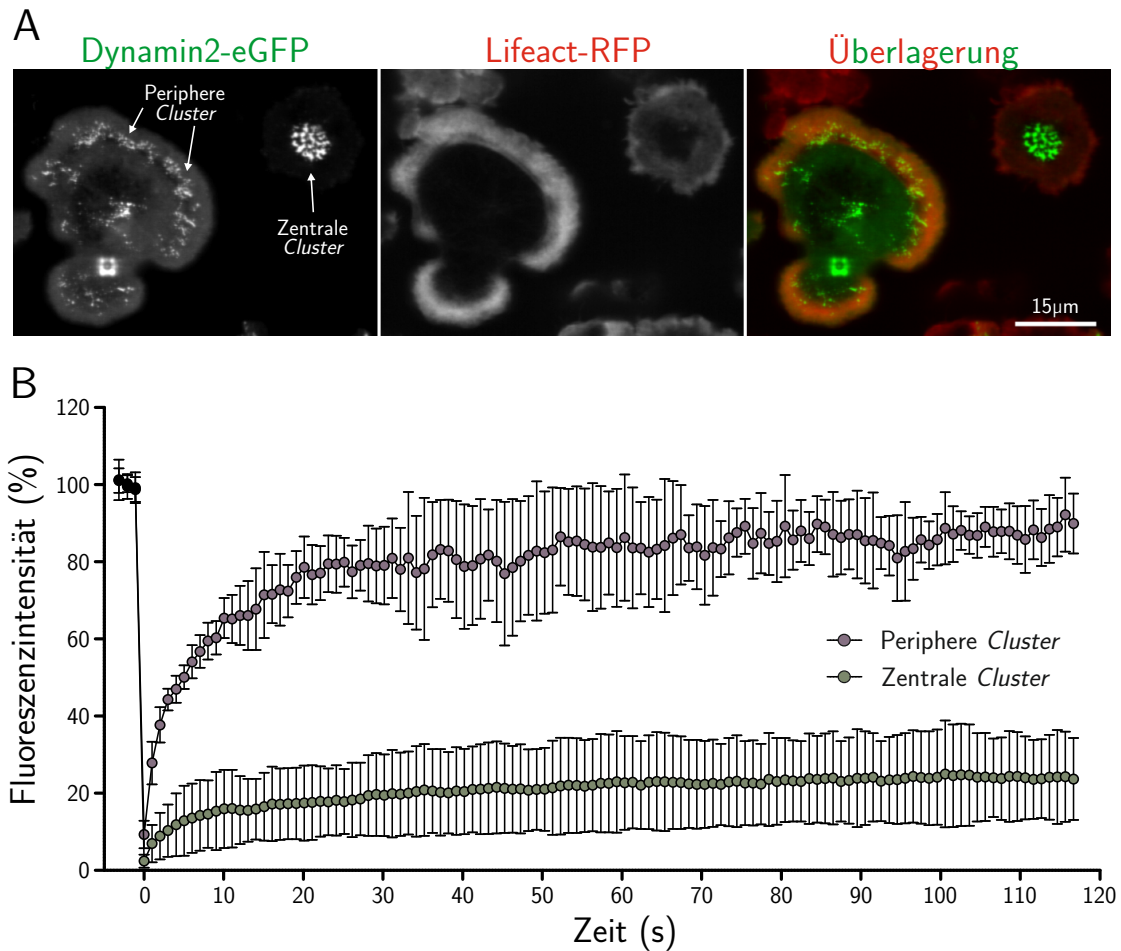


Abbildung 3.33: **Die Mobilität von Dynamin2-eGFP unterscheidet sich massiv zwischen peripheren und zentralen Clustern an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen.** FRAP-Analyse (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) von Dynamin2-eGFP in Clustern an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen. Dynamin2-eGFP (sowie Lifeact-RFP in (A)) überexprimierende Jurkat E6.1 T-Zellen wurden zuvor auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) ausgesät und für 15 min (Bildung peripherer Cluster) beziehungsweise 4 h (Bildung zentraler Cluster) adhären gelassen. (A) Beispielaufnahme von Jurkat E6.1 T-Zellen mit peripheren (links) und zentralen (rechts) Dynamin2-eGFP-Clustern. (B) FRAP-Analyse des Dynamin2-eGFP Signals in peripheren und zentralen Clustern, welche mit Hilfe eines konfokalen LSMs durchgeführt wurde. Die Bildaufnahmen erfolgten mit 1 Hz für 120 s, wobei nach 3 s das Areal von Interesse gebleicht wurde. Schließlich wurde die Fluoreszenzintensität für die jeweiligen Messzeitpunkte prozentual zum durchschnittlichen Ausgangswert bestimmt und graphisch dargestellt. Mittelwert + S.D., n = 9 (periphere Cluster), n = 14 (zentrale Cluster).

Hätten die wesentlich später geformten zentralen Dynamin2-Cluster ebenfalls eine Funktion in genau diesen Signalkaskaden, müsste man davon ausgehen, dort auch die entsprechenden aktiven Signaltransduktoren zu finden. Interessanterweise konnte jedoch keine Co-Lokalisation zwischen Dynamin2-eGFP und den phosphorylierten Proteinen Pyk2, FAK sowie RapGEF1 in den zentralen Dynamin2-eGFP-Clustern beobachtet werden,

während diese Proteine nach wie vor in peripheren Akkumulationen von Dynamin2-eGFP an der basalen Plasmamembran zu finden waren, falls solche noch zu sehen waren (Abbildung 3.34). Dies spricht dafür, dass die zentralen Dynamin2-*Cluster*, welche erst Stunden nach der eigentlichen Adhäsion gebildet werden und meist gleichzeitig mit einem Zusammenziehen der Zellen auftreten, eine grundlegend andere Funktion haben als die peripheren Dynamin2-haltigen Signalkomplexe.

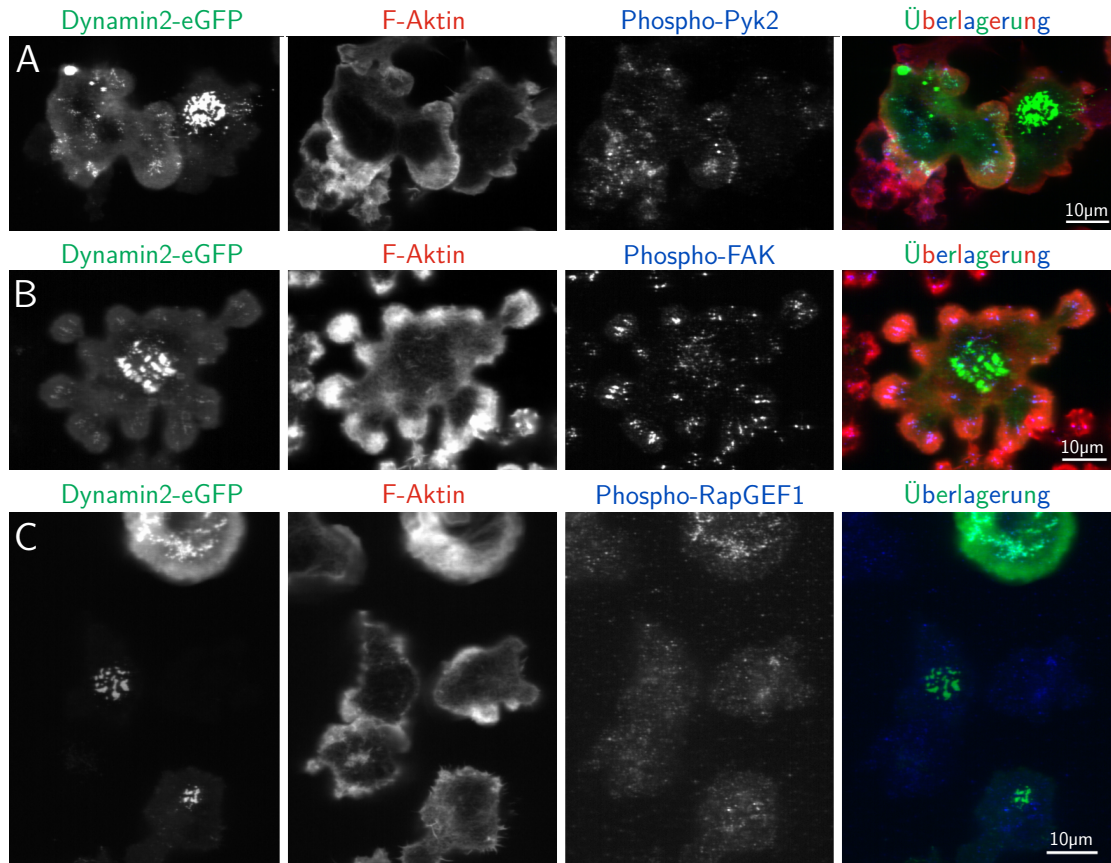


Abbildung 3.34: **Dynamin2-eGFP co-lokalisiert nicht mit Pyk2, FAK, oder RapGEF1 in ihrem aktivierten Zustand in zentralen *Clustern* an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen.** Repräsentative Aufnahmen von Dynamin2-eGFP überexprimierenden Jurkat E6.1 T-Lymphozyten. Die Zellen wurden auf einer Oberfläche beschichtet mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- (10 μ g/ml) und α -CD28-Antikörpern (20 μ g/ml) für 4 h ausgesät und anschließend fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluorochromiertem Phalloidin markiert. Zudem wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe Phospho-spezifischer Antikörper von (A) Phospho-Pyk2 (Tyrosin402), (B) Phospho-FAK (Tyrosin397) und (C) Phospho-RapGEF1 (Tyrosin504) durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen LSMs und mit Fokus auf die basale Plasmamembran analysiert.

3.15 Dynamin2 hat keinen Einfluss auf die Integrin-Oberflächenexpression sowie die Regulation der Integrin-Affinität

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist Dynamin2 durch seine Rolle bei der Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 essentiell für die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Zellen. Wie genau sich jedoch eine fehlerhafte Dynamin2-abhängige Aktivierung von Rap1 auf die Integrine selber auswirkt, wurde bisher nicht geklärt. Integrine können auf zwei verschiedene Arten aktiviert werden. Einerseits kann eine Aktivierung über Konformationsänderungen der einzelnen Integrinmoleküle erfolgen, welche den Adhäsionsrezeptoren unterschiedliche Affinitäten für ihre Liganden verleihen können. Diese Art der Integrin-Aktivierungskontrolle wird daher Affinitätsregulation genannt. Andererseits kann die Aktivität der Integrine aber auch durch die Bildung von Integrin-*Clustern* erhöht werden, ein Vorgang, der durch die sogenannte Valenzregulation kontrolliert wird [191]. Rap1 wurde bereits in beiden dieser Integrin-Aktivierungsmechanismen impliziert [33]. Daher sollte geklärt werden, ob Affinitäts- und/oder Valenzregulation von Integrinen durch die Inhibition von Dynamin2 in humanen T-Lymphozyten beeinflusst werden.

Bevor jedoch Aktivierungsmechanismen der Integrine analysiert werden konnten, musste zunächst geklärt werden, ob die Inhibition von Dynamin2 eine Auswirkung auf die Oberflächenexpression von Integrinen hat. Sollte dies der Fall sein, könnte die fehlerhafte Adhäsion theoretisch bereits durch einfache Expressionsunterschiede zwischen den verschieden-behandelten Zellen zu erklären sein. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab jedoch keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD18 (β_2 -Integrin-Kette) und CD29 (β_1 -Integrin-Kette) auf ruhenden humanen primären CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.35 A), welche entweder mit DMSO oder mit Dynasore behandelt worden waren. CD18 und CD29 sind an der Bildung der meisten Integrin-Heterodimere beteiligt, die auf diesen Zellen exprimiert werden, so auch an dem ICAM-1-bindenden LFA-1 (CD18) und dem VCAM-1-bindenden VLA-4 (CD29). Aktivierte Effektor-T-Zellen können ein etwas anderes Spektrum an Integrinen exprimieren als ihre naiven Vorgänger [192]. Doch auch in aktivierten humanen CD4⁺ Effektor-T-Zellen konnte kein Einfluss der chemischen Inhibition von Dynamin2 auf die Oberflächenexpression von verschiedenen Integrin-Ketten beobachtet werden (Abbildung 3.35 B). Dies lässt die Annahme zu, dass Dynamin2 die Oberflächenexpression von Integrinen in humanen T-Zellen nicht beeinflusst.

Da kein Unterschied in der Expression der Integrine gefunden werden konnte, könnte die Erklärung für die Adhäsionsdefizienz in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 in der Aktivierung der Integrine liegen. Um zu überprüfen, ob die Affinitätsregulation der

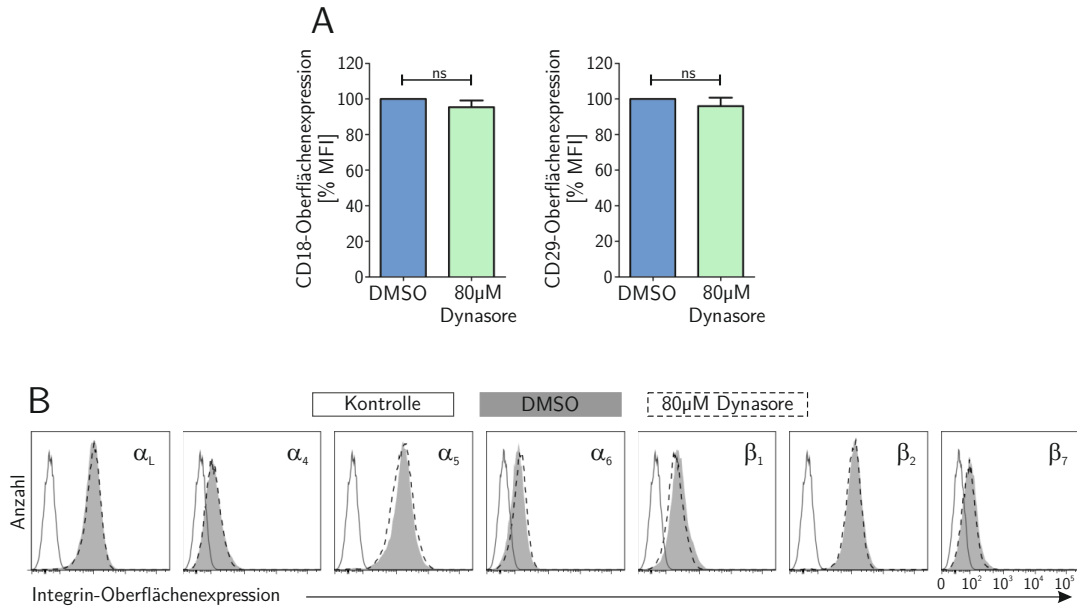


Abbildung 3.35: **Die Oberflächenexpression von Integrinen auf humanen $CD4^+$ T-Zellen ist nicht abhängig von Dynamin2.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD18 (β_2 -Integrin-Kette, $n = 4$) und CD29 (β_1 -Integrin-Kette, $n = 3$) auf ruhenden humanen primären $CD4^+$ T-Zellen. Die Lymphozyten wurden zuvor für 2 h mit DMSO als Kontrolle oder 80 μ M Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert. Die Graphen zeigen die relative Expression bezogen auf die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), wobei die DMSO-Kontrolle auf 100 % gestzt wurde. Mittelwert + S.E.M., ns bedeutet nicht signifikant. (B) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von den Integrin-Ketten α_L , α_4 , α_5 , α_6 , β_1 , β_2 und β_7 auf aktivierten primären humanen $CD4^+$ Effektor-T-Zellen. Die Lymphozyten wurden zuvor für 2 h mit DMSO als Kontrolle oder 80 μ M Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert. Repräsentative Histogramme der Integrin-Oberflächenexpressionen (MFI) sind dargestellt. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Adhäsionsrezeptoren durch die chemische Inhibition von Dynamin2 beeinträchtigt wird, wurden spezifische monoklonale Reporter-Antikörper verwendet, welche nur dann an die entsprechenden Integrin-Ketten binden können, wenn sich das Integrinmolekül in einem bestimmten Affinitätszustand befindet. Unterschieden wird hierbei zwischen drei Stadien, den Integrin-Konformationen mit niedrigen, intermediären und hohen Affinitäten für ihre Liganden. Integrine mit niedriger Affinität binden nicht an ihre Liganden und bilden in ruhenden T-Zellen den Grundzustand der Integrin-Konformation. Ein Wechsel in die Konformationen mit intermediärer oder hoher Affinität kann somit als Aktivierung der Integrine verstanden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper eingesetzt, welche ausschließlich an β_2 -Integrine mit Konformationen intermediärer Affinität (KIM127 [137]) oder hoher Affinität (mAb24 [139], 327C [136]) binden können. Die Analyse erfolgte an primären humanen $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Überraschenderweise konnten jedoch keine Unterschiede in der basalen, PMA- sowie Mn^{2+} -induzierten Expression der Aktivierungs-Epitope von β_2 -Integrinen zwischen

DMSO- und Dynasore-behandelten T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.36).

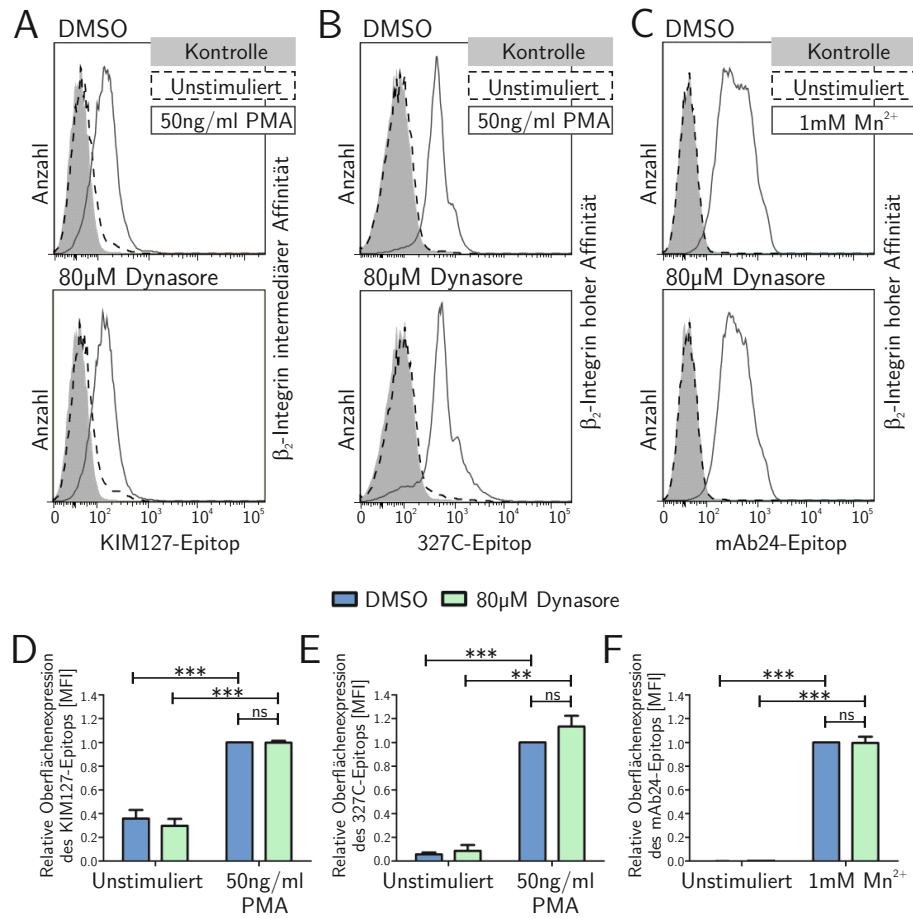


Abbildung 3.36: Dynamin2 hat keinen Einfluss auf die Affinitätsregulation von β_2 -Integrinen in humanen $CD4^+$ T-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von verschiedenen β_2 -Integrin-Aktivierungsepitopen auf der Oberfläche von ruhenden humanen primären $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe von monoklonalen Reporter-Antikörpern. Falls angegeben, wurden die Zellen entweder für 30 min mit 50 ng/ml PMA oder 1 mM Mn^{2+} stimuliert. Die Lymphozyten wurden zuvor mit DMSO als Kontrolle oder 80 μ M Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert. Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper KIM127 (intermediäre Affinität, (A), (D), $n = 6$), 327C (hohe Affinität, (B), (E), $n = 4$) sowie mAb24 (hohe Affinität, (C), (F), $n = 6$). Jeweils ein repräsentatives Histogramm (MFI, (A-C)) sowie die relativen Oberflächenexpression bezogen auf die MFI-Werte der stimulierten DMSO-Proben, welche auf eins gesetzt wurden (D-F), sind dargestellt. Mittelwert + S.E.M., ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Auch die basale sowie die PMA-induzierte Expression eines Aktivierungs-Epitops auf β_1 -Integrinen, welches durch den monoklonalen Reporter-Antikörper HUTS-4 erkannt und nur auf β_1 -Integrinen mit hoher Affinität für ihre Liganden induziert wird [140], wurde durch die Inhibition von Dynamin2 nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.37). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Dynamin2 keine wichtige Rolle bei der

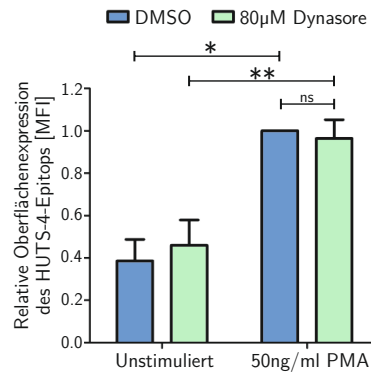


Abbildung 3.37: **Dynamin2 hat keinen Einfluss auf die Affinitätsregulation von β_1 -Integrinen in humanen $CD4^+$ T-Zellen.** Durchflusszytometrische Analyse der Expression eines β_1 -Integrin-Aktivierungsepitops auf der Oberfläche von ruhenden humanen primären $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe des monoklonalen Reporter-Antikörpers HUTS-4, welcher β_1 -Integrine hoher Affinität spezifisch bindet. Falls angegeben, wurden die Zellen für 30 min mit 50 ng/ml PMA stimuliert. Die Lymphozyten wurden zuvor mit DMSO als Kontrolle oder 80 μ M Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert. Die relative Oberflächenexpression bezogen auf den MFI-Wert (mittlere Fluoreszenzintensität) der stimulierten DMSO-Probe, welche auf eins gesetzt wurde, ist dargestellt. Mittelwert + S.E.M., ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$, n = 3, ns bedeutet nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Affinitätsregulation von Integrinen in humanen T-Zellen spielt.

Es ist interessant, dass T-Zellen, welche über kein funktionelles Dynamin2 verfügen, zwar Integrine in Konformationen intermediärer und hoher Affinität für ihre Liganden versetzen können, jedoch trotzdem eine massive Adhäsionsdefizienz aufweisen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass diese Konformationsänderungen alleine noch keine stabile Integrin-vermittelte Adhäsion vermitteln, sondern weitere, von Dynamin2 und Rap1 abhängige Schritte, für diesen Prozess wichtig sind. Um dies zu überprüfen, wurde ein weiterer monoklonaler Antikörper (KIM185) eingesetzt, welcher an β_2 -Integrine bindet. Dieser Antikörper bindet jedoch, im Gegensatz zu den Reporter-Antikörpern, β_2 -Integrine aller möglichen Konformationen. Die Bindung führt dann allerdings dazu, dass die β_2 -Integrine mechanisch in eine Konformation mit hoher Affinität für ihre Liganden gezwungen werden [138]. Mit diesem Antikörper als Stimulus wurde dann die statische Adhäsion humaner $CD4^+$ T-Zellen auf ICAM-1-Fc analysiert. Während mit DMSO versetzte Kontrollzellen nach der Stimulation mit KIM185 eine starke Adhäsion auf ICAM-1-Fc aufwiesen, wurde diese durch die Zugabe von Dynasore massiv herabgesetzt (Abbildung 3.38 A, B), obwohl keine Unterschiede in der Bindung von KIM185 an die unterschiedlich behandelten Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 3.38 C). Dies bestätigt die Annahme, dass humane T-Zellen neben der Ausbildung von Integrin-Konformationen hoher Affinität mindestens einen weiteren, von Dynamin2 abhängigen Prozess benötigen, um eine stabile Integrin-vermittelte Zelladhäsion auszuführen.

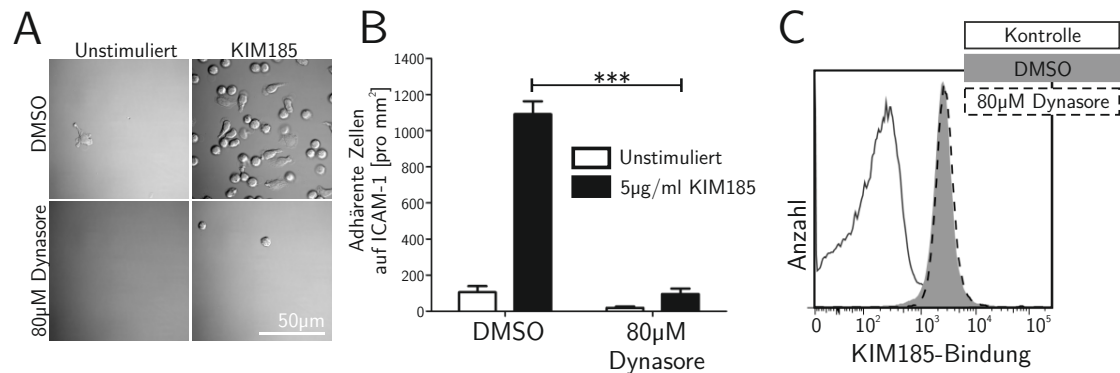


Abbildung 3.38: **Dynamin2 ist essentiell für die KIM185-induzierte statische Adhäsion von humanen $CD4^+$ T-Zellen auf ICAM-1-Fc.** (A, B) Analyse der statischen Adhäsion von primären humanen $CD4^+$ T-Zellen auf dem Integrin-Liganden ICAM-1-Fc. Die Lymphozyten wurden entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 µM Dynasore zur Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität inkubiert. Falls angegeben, wurden die Zellen mit 5 µg/ml KIM185 stimuliert, einem Antikörper, welcher durch seine Bindung β_2 -Integrine mechanisch in eine Konformation mit hoher Affinität für ihre Liganden zwingt. (A) Detaillierte Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) repräsentativer ICAM-1-Fc beschichteter Areale mit adhärenen humanen $CD4^+$ T-Zellen nach Inkubation mit DMSO oder Dynasore und Stimulation, falls angegeben, mit 5 µg/ml KIM185. (B, n = 4) Quantifizierung der absoluten Anzahl adhärenter Zellen pro mm² 45 min nach der Stimulation. Mittelwert + S.E.M., *** $P \leq 0,001$. (C) Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des Antikörpers KIM185 an β_2 -Integrine (MFI) auf der Oberfläche humaner $CD4^+$ T-Zellen. Ein repräsentatives Histogramm ist dargestellt. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

3.16 Dynamin2 spielt eine wichtige Rolle bei der Valenzregulation von Integrinen

Die kleine GTPase Rap1, deren Aktivierung in humanen T-Zellen von Dynamin2 reguliert wird, kann über verschiedene Arten Einfluss auf die Aktivität von Integrinen nehmen. Zum einen wurde sie in der Regulation der Integrin-Affinität, zum anderen aber auch in der Regulation der Integrin-Valenz impliziert. Beide Funktionen sind von großer Wichtigkeit für die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen. Wie in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden konnte, weisen humane T-Zellen, welche über kein funktionelles Dynamin2 verfügen, allerdings keine fehlerhafte Regulation der Integrin-Affinität auf, trotz ihrer massiven Adhäsionsdefizienz.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden analysiert, ob im Gegensatz dazu die Valenzregulation von Integrinen, also deren *Clustering*, durch eine Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität beeinflusst werden kann. Dafür wurden ruhende primäre humane $CD4^+$ T-Zellen zunächst entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert. Die Zellen wurden dann in Suspension fixiert, CD18 (die β_2 -Integrin-Kette) mittels einer Immunfluoreszenzfärbung markiert und die Zellen in einem konfoka-

len LSM analysiert. Anschließend wurde zudem ein Regenbogen-Filter über die Aufnahmen gelegt, welcher der Intensität des CD18-Signals ein entsprechendes Farbmuster zuordnet. So konnte der Anteil an Zellen, welche CD18-Cluster hoher Intensität aufwiesen, wesentlich einfacher bestimmt werden. Ein sehr hoher Anteil der DMSO-behandelten T-Zellen besaß in der Tat stark ausgeprägte CD18-Cluster (durchschnittlich circa 70 % der Lymphozyten), wohingegen die Formation von CD18-Clustern in Dynasore-behandelten T-Zellen massiv herabgesetzt war (nur circa 20 % der Zellen wiesen CD18-Cluster auf, Abbildung 3.39). Dieses Ergebnis zeigt, dass Dynamin2 eine wichtige Rolle in der basalen Integrin-Valenzregulation spielt.

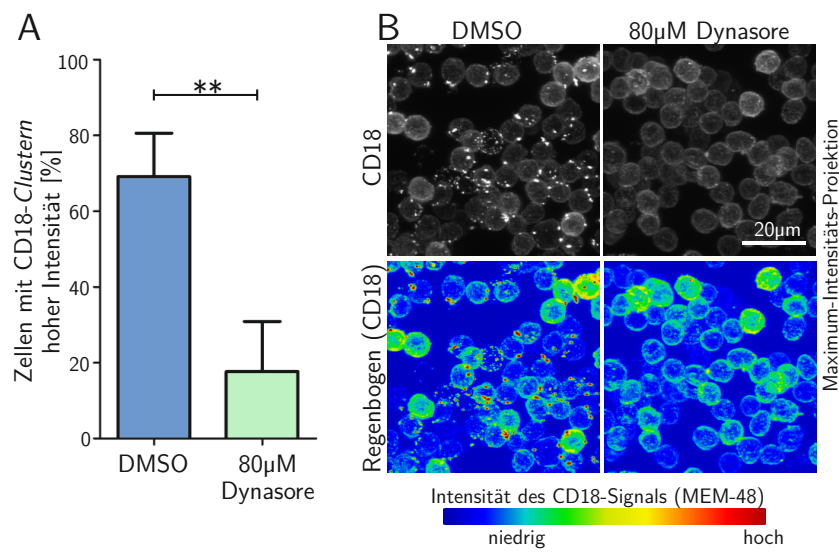


Abbildung 3.39: **Die basale Regulation der Integrin-Valenz ist stark abhängig von Dynamin2.** Analyse des *Clusterings* von β_2 -Integrinen auf humanen ruhenden $CD4^+$ T-Zellen in Suspension. Die Zellen wurden entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 μ M Dynasore für 2 h inkubiert und anschließend fixiert. CD18 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung (monoklonaler Antikörper MEM-48) markiert und die Zellen in Suspension in Mikrokanälen ausgesät. Nach dem Absinken der Lymphozyten erfolgte eine Analyse mit Hilfe eines konfokalen LSMs. Es wurden Z-Stapel aufgenommen (Intervall von 0,3 μ m) und zu Maximum-Intensitäts-Projektionen zusammengesetzt. Zudem wurde ein Regenbogenfilter über die Aufnahmen gelegt, um CD18-Cluster hoher Intensität leichter ausfindig machen zu können. (A, $n = 4$) Der prozentuale Anteil an T-Zellen mit CD18-Clustern hoher Intensität wurde ermittelt. Pro durchgeführtem Experiment wurden mindestens 200 Zellen ausgewertet. Mittelwert + S.E.M., $**P \leq 0,01$. (B) Repräsentative Maximum-Intensitäts-Projektionen zugehörig zu (A). Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Um zu untersuchen, ob nicht nur die basale, sondern auch die Integrin-Valenzregulation unter Anwesenheit von Integrin-Liganden und/oder externen Stimuli von Dynamin2 abhängig ist, wurden ruhende humane $CD4^+$ T-Zellen auf Oberflächen ausgesät, die entweder nur mit ICAM-1-Fc oder mit ICAM-1-Fc sowie aktivierenden α -CD3- und α -CD28-Antikörpern beschichtet waren. Zuvor wurden die Zellen mit CFSE (Carboxyfluorescein-

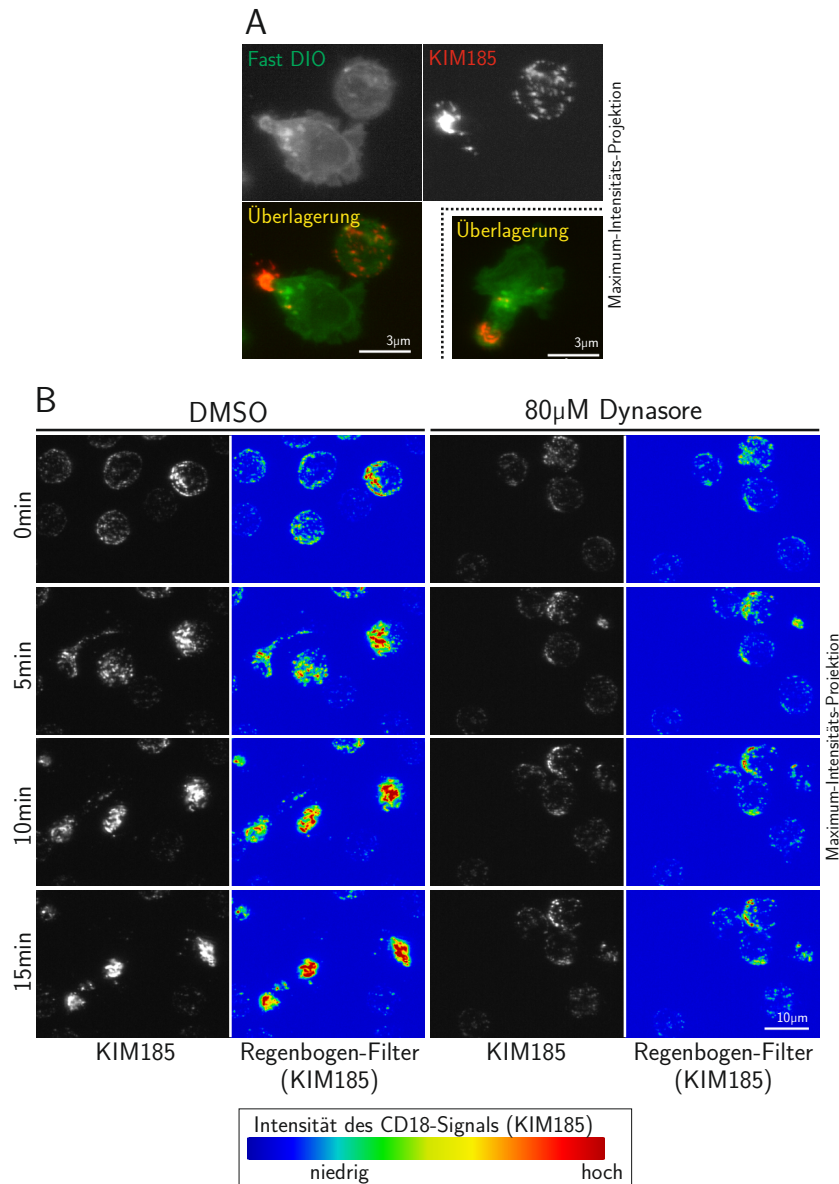


Abbildung 3.41: **Dynamin2 reguliert das *Clustering* von KIM185-gebundenen β_2 -Integrinen.** (A) Analyse der räumlichen Verteilung von KIM185-gebundenen β_2 -Integrinen (hoher Affinität) auf polarisierten und unpolarisierten humanen $CD4^+$ T-Zellen in Suspension. Repräsentative Maximum-Intensitäts-Projektionen von Z-Stapeln (Intervall von 0,3–0,5 μm) aufgenommen mit einem konfokalen LSM sind dargestellt. Die Zellen wurden mit dem Membranmarker Fast DIO sowie fluoreszent markiertem KIM185-Antikörper behandelt. (B) Zeitliche Analyse des *Clusterings* von KIM185-gebundenen β_2 -Integrinen (hoher Affinität) auf ruhenden humanen $CD4^+$ T-Zellen ausgesät auf einer mit ICAM-1-Fc beschichteten Oberfläche. Die T-Lymphozyten wurden entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 80 μM Dynasore zur Inhibition von Dynamin2 inkubiert sowie mit fluoreszent markiertem KIM185-Antikörper behandelt. Die Analyse erfolgte durch die Aufnahme von Z-Stapeln (1 μm Intervall) über einen Zeitraum von 15 min mit Hilfe eines konfokalen LSMs. Repräsentative Maximum-Intensitäts-Projektionen von verschiedenen Zeitpunkten der Analyse sind dargestellt. Abbildung modifiziert nach Eppler *et al.*, 2017 [163].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von Dynamin2 keine Fehlregulation der Integrin-Affinität zu Folge hatte. Trotzdem adhärten Zellen mit inhibiertem Dynamin2 nicht auf Integrin-Liganden, was vermuten lässt, dass neben der Regulation der Integrin-Affinität auch noch mindestens ein weiterer Prozess für die T-Zelladhäsion essentiell ist, wie beispielsweise die Valenzregulation von Integrinen. Es wäre somit zu erwarten, dass die Bindung von KIM185 an CD18 nicht nur zu einer erhöhten Affinität des Integrins für seinen Liganden führt, sondern auch ein *Clustering* von β_2 -Integrinen zur Folge hat. In der Tat konnte in polarisierten $CD4^+$ T-Lymphozyten ein massives *Clustering* von KIM185-gebundenem CD18 beobachtet werden, wobei die CD18-*Cluster* immer im Uropod der Zellen zu finden waren (Abbildung 3.41 A), welcher jedoch, wie bereits beschrieben, in Dynasore-behandelten T-Lymphozyten nicht mehr effizient ausgebildet werden konnte (Abbildung 3.14 A und 3.17 B). Die Analyse von lebenden $CD4^+$ T-Zellen, welche auf ICAM-1-Fc zur Adhäsion ausgesät worden waren, ergab zudem, dass KIM185-gebundenes CD18 während des Adhäsionsprozesses in große *Cluster* zusammengezogen wurde, wohingegen dieser Prozess durch die Zugabe von Dynasore stark inhibiert wurde (Abbildung 3.41 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von T-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper KIM185 auch zu einem *Clustering* der β_2 -Integrine führt, welches wiederum auf die Aktivität von Dynamin2 angewiesen ist.

4 Diskussion

Das Immunsystem ist ein dezentralisiertes Organ, dessen Bestandteile über den gesamten Körper verteilt sind. Eine gut koordinierte Bewegung der einzelnen Immunzellen durch den Körper ist daher eine Grundvoraussetzung für funktionelle und effektive Immunantworten. Während ihrer Reise treffen Leukozyten auf Gewebe unterschiedlichster Komposition und Architektur, an welche sie sich entsprechend anpassen müssen, um ihr Ziel zu erreichen. Die Adaption der Zelladhäsion ist ein sehr wichtiger Aspekt bei diesem Vorgang. Während innerhalb bestimmter Umgebungen, wie beispielsweise dem Interstitium, die Adhäsion von Immunzellen nicht zwingend benötigt wird, ist sie wiederum essentiell für andere Prozesse, wie für die Extravasation von Leukozyten aus Blutgefäßen. Immunzellen können daher ihre Adhäsionsfähigkeit sehr schnell und präzise kontrollieren und an gegebene Situationen anpassen. Dies geschieht über die Regulation der Aktivität ihrer wichtigsten Adhäsionsmoleküle, der Integrine [8].

Die Integrin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten nimmt somit eine zentrale Funktion für ein intaktes Immunsystem ein, was durch die Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (LAD) verdeutlicht wird. LAD-Patienten leiden an rezidivierenden Infekten, welche auf erblich erworbene Mutationen in Genen mit wichtiger Funktion in der Integrin-vermittelten Immunzelladhäsion zurückzuführen sind (beispielsweise das β_2 -Integrin codierende Gen bei LAD-I oder das Kindlin3 codierende Gen bei LAD-III) und nicht selten tödlich verlaufen können. Des Weiteren können Integrine aber auch bei pathologischen Prozessen von großer Wichtigkeit sein, wie bei der Metastasierung von Krebszellen oder bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen [133]. Dies verdeutlicht, wie wichtig eine möglichst exakte Kenntnis der molekularen Regulationsmechanismen von Integrinen ist, welche trotz langer und intensiver Forschung noch immer unzureichend geklärt sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Regulation von Integrinen sowie Integrin-vermittelten Prozessen in humanen Lymphozyten mit besonderer Berücksichtigung der großen GTPase Dynamin2, welche bisher vor allem im Kontext der Endozytose studiert wurde, untersucht werden. Unter Verwendung von Dynasore und Dynole 34-2, zweier chemisch nicht verwandter Inhibitoren der Dynamin2 GTPase-Aktivität, sowie durch siRNA-vermittelte RNA-Interferenz der Dynamin2-Expression, wurde die Funktion des Proteins in humanen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* analysiert. Neben diversen funktionalen

Versuchsaufbauten wurde zudem auch eine Reihe biochemischer, molekularbiologischer sowie zellbiologischer Methoden verwendet, um den Einfluss von Dynamin2 auf die Integrine humaner Lymphozyten zu erforschen. Im Folgenden werden die dabei erhaltenen Ergebnisse im Kontext bereits veröffentlichter Literatur diskutiert.

4.1 Dynamin2 reguliert die Integrin-vermittelte Adhäsion und Migration humaner Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner CD4⁺ T-Zellen stark abhängig ist von der großen GTPase Dynamin2. Dies wird verdeutlicht durch den Befund, dass das Blockieren der Dynamin2 GTPase-Aktivität durch die Zugabe der kleinen chemischen Inhibitoren Dynasore oder Dynole 34-2 zu einer massiven Adhäsionsdefizienz humaner CD4⁺ T-Zellen auf immobilisierten Integrin-Liganden führte (Abbildungen 3.3 und 3.5). Da sowohl Dynasore als auch Dynole 34-2 ebenfalls Dynamin1 und Dynamin3 inhibieren können [164, 166], musste überprüft werden, welche Isoformen der großen GTPase in humanen CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden. Wie auch bereits schon für murine CD4⁺ T-Zellen beschrieben [130], konnte eine Expression in humanen CD4⁺ T-Zellen nur für das ubiquitär exprimierte Dynamin2 nachgewiesen werden, nicht jedoch für Dynamin1 und Dynamin3, welche vor allem in neuronalen Geweben zu finden sind ([80], Abbildung 3.2). Daher kann in humanen CD4⁺ T-Zellen bei der Verwendung von Pan-Dynamin-Inhibitoren wie Dynasore oder Dynole 34-2 davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem inhibierten Dynamin nur um die Isoform Dynamin2 handelt und die beobachteten Effekte dementsprechend auf die Inhibition dieses Proteins zurückzuführen sind. Die Tatsache, dass die beiden verwendeten Inhibitoren chemisch nicht verwandt sind und ihr Einsatz trotzdem den gleichen Phänotyp zu Folge hatte, minimiert zudem die Gefahr, dass die gemachten Beobachtungen auf unspezifischen Dynamin-unabhängigen Seiteneffekten beruhen [157]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Annahme zusätzlich gestützt durch die Verwendung verschiedener Dynamin2-mRNA-targetierender siRNA-Oligonukleotide, welche transfiziert in humane CD4⁺ T-Lymphozyten zu einer Herunterregulation der Dynamin2-Expression und dadurch ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung der Adhäsion dieser Zellen führten (Abbildung 3.5).

Die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Lymphozyten ist von großer Bedeutung für das Immunsystem und kommt während verschiedener Prozesse und in unterschiedlichsten Umgebungen zum Einsatz [193]. So findet die Interaktion zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) meist in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten statt, in denen keine starken Strömungen herrschen [194]. Im Gegen-

satz dazu sind Leukozyten bei der Extravasation aus Blutgefäßen dem Blutstrom ausgesetzt, was ein Einwirken ausgeprägter Scherkräfte auf die Zellen mit sich bringt. Diese Scherkräfte können sich zusätzlich aktivierend auf Integrine auswirken, was zur Folge hat, dass die Mechanismen der Integrin-Aktivierung unter laminarer Strömung nicht exakt den gleichen Regeln unterworfen sind wie unter statischen Bedingungen [195]. Humane $CD4^+$ T-Zellen, welche entweder mit chemischen Inhibitoren der Dynamin2 GTPase-Aktivität versetzt oder mit Dynamin2-spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, wiesen sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen massive Adhäsionsdefizite auf (Abbildungen 3.3, 3.5, 3.6 und 3.7), was für eine sehr grundlegende Funktion von Dynamin2 in der Integrin-vermittelten Lymphozytenadhäsion spricht, die unabhängig von der Anwesenheit von Scherkräften ist. Eine zentrale Rolle der großen GTPase in der Regulation Integrin-vermittelter Adhäsion wird zudem unterstützt durch die Beobachtung, dass T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 sowohl in der T-Zell-Rezeptor- (TCR) als auch Chemokin-stimulierten Adhäsion auf Integrin-Liganden stark beeinträchtigt waren, welche zu großen Teilen auf unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden beruhen [196, 197]. Auch die Stimulation mit dem Diacylglycerol-Strukturanalog Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), welches ein Aktivator der Proteinkinase C ist, direkt durch die Plasmamembran diffundieren kann und somit nicht auf die Signalgebung von membranständigen Rezeptoren angewiesen ist [198, 199], konnte in T-Lymphozyten, aber auch anderen humanen Lymphozytentypen wie B-Zellen oder NK-Zellen (Abbildung 3.4), nach Inhibition oder Herunterregulation von Dynamin2 im Vergleich zu Kontrollzellen keine effektive Adhäsion induzieren. Dass die mangelhafte Adhäsion Dynamin2-defizienter Zellen auf unterschiedlichen Integrin-Liganden wie ICAM-1, VCAM-1 und Fibronectin zu beobachten war, spricht zudem dafür, dass es sich nicht um einen für ein bestimmtes Integrin spezifischen Effekt handelt, da die soeben erwähnten Integrin-Liganden von unterschiedlichen Integrinen wie LFA-1, VLA-4 und VLA-5 gebunden werden [169]. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine zentrale Schlüsselrolle der großen GTPase Dynamin2 in der Regulation Integrin-vermittelter Lymphozytenadhäsion hin.

Neben der Adhäsion müssen Immunzellen auch ihr migratorisches Verhalten dynamisch an sich schnell verändernde Situationen anpassen können, um effektive Immunantworten zu gewährleisten [11]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Integrin-vermittelten Adhäsion ebenfalls die Migration von humanen $CD4^+$ T-Lymphozyten analysiert. So konnte beobachtet werden, dass primäre T-Zellen, ausgesetzt auf einer 2-dimensionalen Oberfläche beschichtet mit dem LFA-1-Liganden ICAM-1, eine effiziente Chemokinese aufwiesen, nachdem sie uniform mit dem Chemokin CXCL12 stimuliert worden waren. Dieser Effekt blieb jedoch gänzlich aus, wenn die Zellen mit dem Dynamin2-Inhibitor Dynasore versetzt wurden (Abbildung 3.8). Es stellt sich somit die Frage, aus welchem Grund T-Lymphozyten nach chemischer Inhibition von

Dynamin2 nicht mehr effektiv auf einer mit ICAM-1 beschichteten Oberfläche migrieren können. Da bekannt ist, dass CXCR4, der Rezeptor des Chemokins CXCL12, nach Bindung seines Liganden internalisiert wird [200], und Dynamin2 ein wichtiges Protein des endozytotischen Apparates ist, wurde die Internalisierung des Chemokinrezeptors in Dynasore-behandelten T-Zellen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die stetig verlaufende, Liganden-unabhängige Internalisierung von CXCR4 in Dynamin2-inhibierten T-Lymphozyten in der Tat beeinträchtigt war, die Liganden-abhängige Internalisierung nach Zugabe von CXCL12 in diesen Zellen jedoch sehr effektiv verlief (Abbildung 3.9). Generell wird der Beitrag der Internalisierung von Chemokinrezeptoren zu deren Funktion in Signaltransduktionsprozessen kontrovers diskutiert, da diese Rezeptoren primär Signale über an sie gekoppelte heterotrimere G-Proteine weitervermitteln [201]. Tatsächlich wiesen Dynasore-behandelte T-Zellen keine Defizite in der CXCL12-induzierten Chemotaxis durch einen *Transwell*-Filter auf (Abbildung 3.10). Die Tatsache, dass Dynasore-behandelte T-Zellen grundsätzlich funktionell auf einen CXCL12-Gradienten reagieren können, führt zu der Annahme, dass Dynamin2 keine wichtige Rolle in der CXCL12-induzierten Migration von T-Zellen spielt, was durch weitere bereits publizierte Arbeiten zusätzlich bestätigt wird [124, 130]. Doch wie nimmt das Protein dann Einfluss auf die Migration humaner T-Zellen auf 2-dimensionalem ICAM-1? Es ist bekannt, dass die Migration von Zellen auf 2-dimensionalen Oberflächen stark von Integrinen abhängig ist, welche den Kraft-erzeugenden Apparat innerhalb der Zelle, das Aktomyosin, durch die Membran auf das unter der Zelle befindliche Substrat übertragen. So kann sich die Zelle an diesem Substrat entlangziehen [202]. Amöboid migrierende Zellen wie Leukozyten sind jedoch in der Lage dazu, innerhalb einer räumlich beengenden 3-dimensionalen Umgebung, wie beispielsweise dem Interstitium, durch das reine Zusammenspiel von Protrusion und Kontraktion effektiv zu migrieren, ohne Integrin-vermittelte Adhäsion einsetzen zu müssen [24, 25]. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Dynasore-behandelte Zellen innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels nach Zugabe von CXCL12 sehr effektiv migrieren konnten und nur geringfügig langsamer waren als entsprechende Kontrollzellen (Abbildung 3.10), kann geschlossen werden, dass der komplette Verlust der Migrationsfähigkeit dieser Zellen auf 2-dimensionalem ICAM-1 auf die bereits beschriebene Defizienz in der Integrin-vermittelten Adhäsion zurückzuführen ist. Dies wird zudem von der Beobachtung unterstützt, dass Dynasore-behandelte T-Lymphozyten auch auf 2-dimensionalem VCAM-1, welches ebenso wie das für die 3-dimensionalen Gele verwendete Kollagen von β_1 -Integrinen gebunden werden kann [169], ebenfalls keinerlei Motilität aufwiesen (Abbildung 3.11), was somit Integrin-spezifische Effekte (ICAM-1 ist ein β_2 -Integrin-Ligand) ausschließt.

4.2 Weder Endozytose noch F-Aktin-Polymerisierung sind essentiell für die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Zellen

Die Mitglieder der Dynamin-Familie, und somit auch Dynamin2, wurden bisher vor allem im Kontext von Endozytose, Membran-Dynamik sowie intrazellulärem Vesikeltransport studiert, was dazu führte, dass bis zum heutigen Tage ein enormes Wissen bezüglich der Funktionsweise der großen GTPasen innerhalb dieser essentiellen Prozesse angesammelt wurde [203]. Dynamin2 ist das einzige ubiquitär exprimierte klassische Dynamin und nimmt somit auch in Leukozyten eine Schlüsselrolle in der Regulation des vesikulären Transports ein. Es stellt sich daher die Frage, ob der beobachtete Adhäsionsphänotyp von T-Lymphozyten, welche über kein funktionelles Dynamin2 verfügen, eventuell auf eine gestörte Endozytose zurückzuführen sein könnte. Auch wenn bereits gezeigt werden konnte, dass eine veränderte Internalisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 nicht für Defekte in Integrin-vermittelter Adhäsion und Migration verantwortlich ist (Abschnitt 4.1), könnte eine beeinträchtigte Internalisierung anderer Signal-gebender Rezeptoren oder der Integrine selbst eine Erklärung hierfür liefern. So wurde Dynamin2 bereits zuvor in der Internalisierung des T-Zell-Rezeptors (TCRs) impliziert, was sich allerdings primär auf dessen langanhaltende Signalgebung von intrazellulären Membranen aus auswirkt, und so anhaltende Veränderungen während der T-Zellaktivierung im Rahmen der klonalen Expansion reguliert [122]. Die hier gemachten Beobachtungen bezüglich des Einflusses von Dynamin2 auf die Integrin-vermittelte T-Zelladhäsion bewegen sich jedoch im Bereich von Minuten nach Stimulation (unterhalb einer Stunde), was somit eine Beteiligung der langanhaltenden Signalgebung des TCRs von intrazellulären Kompartimenten aus sehr unwahrscheinlich macht. Auch eine Dynamin2-vermittelte Internalisierung von Integrinen wurde bereits beschrieben, jedoch innerhalb von großen und komplizierten Adhäsionsstrukturen stark adhärenter mesenchymaler Zellen wie Fibroblasten [121]. Adhäsionsstrukturen dieser Art, wie beispielsweise reife Fokaladhäsionen oder Podosome, werden in Lymphozyten jedoch nicht ausgebildet [22]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit zudem auch keine Veränderung der Oberflächenexpression verschiedener Integrine auf ruhenden sowie aktivierten T-Zellen beobachtet werden, nachdem diese mit dem Dynamin2-Inhibitor Dynasore behandelt worden waren (Abbildung 3.35). Um zu überprüfen, ob eine Fehlregulation des vesikulären Transports trotzdem die Grundlage für den Adhäsionsdefekt in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 darstellt, wurden zusätzlich unterschiedliche chemische Inhibitoren eingesetzt, welche Endozytose, intrazelluläre Vesikeltransporte sowie Exozytose auf Dynamin2-unabhängige Art und Weise inhibieren können. Die Integrin-vermittelte T-Zelladhäsion unter statischen Bedin-

gungen konnte aber weder durch die Zugabe der Endozytose-Inhibitoren Chlorpromazin oder Monodansylcadaverin [204], noch durch die Zugabe der Exozytose-Inhibitoren Brefeldin A oder Exo1 [205] beeinträchtigt werden. Diese Ergebnisse sprechen deutlich gegen die Annahme, dass eine Dynamin2-abhängige gestörte Dynamik des intrazellulären Vesikeltransports beziehungsweise der Endozytose die Basis für die Adhäsionsdefizienz von T-Zellen ohne Dynamin2-Funktion oder -Expression ist.

Neben Prozessen der Membrandynamik wird Dynamin2 ebenfalls in der Regulation des F-Aktin-Zytoskeletts impliziert [102]. Während diese Funktion auch einen wichtigen Beitrag bei der Vesikelabschnürung im Rahmen der Endozytose leistet [206, 207], konnte weiterhin gezeigt werden, dass Dynamin2 beispielsweise auch die Migration mesenchymaler Zelltypen beeinflussen kann, indem es die F-Aktin-Polymerisierung innerhalb von Lamellipodien beeinflusst [111, 114]. Auch in T-Zellen wurde bereits ein Einfluss von Dynamin2 auf die F-Aktin-Polymerisierung innerhalb der immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und APC beschrieben [107]. In der vorliegenden Arbeit konnte in humanen T-Lymphozyten mittels hochauflösender Mikroskopie ebenfalls eine Interaktion von Dynamin2 mit dem F-Aktin-Zytoskelett beobachtet werden, welche am basalen Kortex adhärenter Zellen stattfand (Abbildung 3.13). Zudem führte die chemische Inhibition der großen GTPase durch die Zugabe von Dynasore zu einer moderaten Verringerung der PMA- oder Chemokin-induzierten F-Aktin-Polymerisierung in humanen $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 3.14). Dies könnte auch eine Erklärung für die bereits beschriebene leicht herabgesetzte Migrationsgeschwindigkeit von humanen T-Zellen innerhalb eines 3-dimensionalen Kollagen-Gels sein, welche stark abhängig von der F-Aktin-Polymerisierung ist ([208], Abbildung 3.10). Interessanterweise wurde bereits ein inhibierender Effekt von Dynasore auf die Formation F-Aktin-basierter dorsaler Membrankräuselungen von Fibroblasten beschrieben, bei denen die drei Isoformen von Dynamin genetisch deletiert worden waren, was daher für einen partiell Dynamin-unabhängigen Effekt von Dynasore auf das Aktin-Zytoskelett spricht [165]. Doch wirkt sich die in ihrer Effektivität etwas herabgesetzte F-Aktin-Polymerisierung in Dynasore-behandelten T-Zellen überhaupt auf deren Integrin-vermittelte Adhäsion aus? Da das F-Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle in der zellulären Mechanotransduktion spielt und somit auch Einfluss auf die Dynamik von Adhäsionen nehmen kann, wäre dies durchaus denkbar [209]. Interessanterweise konnte jedoch unter Verwendung hochpotenter Inhibitoren der F-Aktin-Polymerisierung (Cytochalasin D sowie Latrunculin A) kein Einfluss auf die PMA-induzierte statische Adhäsion primärer $CD4^+$ T-Zellen auf den Integrin-Liganden ICAM-1 und VCAM-1 beobachtet werden, was klar gegen die Annahme spricht, dass die F-Aktin-regulierende Funktion von Dynamin2 die Erklärung für dessen grundlegende Rolle in der Integrin-vermittelten Adhäsion von T-Zellen ist. Ein eindeutiger Einfluss des F-Aktin-Zytoskeletts konnte jedoch auf das Ausbreiten der T-Zellen nach

erfolgreicher Adhäsion beobachtet werden, was zu einer abgerundeten Morphologie der Zellen führte und in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Studien ist [210, 211]. Zudem ist die Beobachtung, dass weder Cytochalasin D noch Latrunculin A dazu in der Lage waren, die statische Adhäsion humaner T-Zellen zu inhibieren, ein weiterer Beweis dafür, dass dieser Prozess nicht durch die Inhibition der Endozytose beeinflusst werden kann, da beide Substanzen auch die von der F-Aktin-Polymerisierung abhängige Endozytose inhibieren [212].

4.3 Die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 ist abhängig von funktionellem Dynamin2

Da weder eine de-regulierte Endozytose noch eine ineffiziente F-Aktin-Polymerisierung die Erklärung für die Adhäsionsdefizienz von T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 sind, stellt sich die Frage, wie die große GTPase Integrin-vermittelte Adhäsion regulieren kann. Um einen generellen Einfluss des Proteins auf grundlegende Signaltransduktionskaskaden zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Aktivierungsmuster der Serin/Threoninkinasen Akt (Proteinkinase B) sowie Erk1/2 (Mitogen-aktivierte Kinasen) nach PMA-Stimulation in humanen CD4⁺ T-Zellen analysiert. Die Aktivierung dieser Kinasen kann durch eine Vielzahl verschiedener externer Stimuli ausgelöst werden und nimmt wiederum Einfluss auf diverse intrazelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Transkription und Migration [179, 213]. Während es kontroverse Berichte über den Einfluss von Dynamin2 auf die Aktivierung von Erk1/2 gibt [122, 214, 215], welche eventuell durch die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme, Stimulanzen und Analyse-Zeitpunkte zu erklären sind, konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von Dynamin2 auf die PMA- und/oder Integrin-vermittelte Aktivierung von Erk1/2 in humanen T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.16). Ebenso konnte keine Veränderung der Aktivierung von Akt in Dynasore-behandelten T-Zellen nachgewiesen werden, was konform geht mit einer Studie, bei der die genetische Deletion von Dynamin2 in murinen T-Zellen ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivierung dieser Kinase hatte ([122], Abbildung 3.16). Somit kann geschlossen werden, dass in dem hier verwendeten experimentellen System Dynamin2 keinen generellen Einfluss auf grundlegende Signalkaskaden hat, welche zu der Aktivierung von Erk1/2 oder Akt führen, und somit normale Signaltransduktionsprozesse weiterhin möglich sind.

Neben dem starken Adhäsionsdefizit konnte in der vorliegenden Arbeit ein weiterer Phänotyp von T-Zellen ohne Dynamin2 GTPase-Aktivität beobachtet werden, welcher sich auf die Polarisierung der Lymphozyten bezieht. So wiesen mit Dynasore behandelte T-Zellen starke Polarisierungsdefizite in Morphologie sowie der Oberflächenverteilung von

Rezeptoren auf (Abbildung 3.17). Die Polarisierung etabliert normalerweise ein zelluläres Vorderende mit ausgeprägtem Lamellipodium oder Pseudopodien, sowie ein Hinterende mit einem Uropod, in den beispielsweise der Rezeptor CD44 lokalisiert [216], und spielt somit bei der Chemokin-induzierten Migration, aber auch der Interaktion von T-Zellen mit APCs eine wichtige Rolle [217, 218]. Während ein Vorderende mit verkleinertem Lamellipodium in Dynasore-behandelten T-Zellen weiterhin ausgebildet wurde, konnte an den Hinterenden der Zellen jedoch kein Uropod mehr detektiert werden (Abbildung 3.14). Bekannte Regulatoren der Lymphozyten-Polarisierung sind die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin (zusammen als ERM bezeichnet), welche während der Polarisierung ebenfalls in den Uropod lokalisieren [219]. Im phosphorylierten Zustand vermitteln diese Proteine eine verstärkte Polarisierung von T-Zellen und können auch Prozesse wie die Migration und die Integrin-vermittelte Adhäsion positiv beeinflussen [220, 221]. Dementsprechend könnte eine fehlregulierte Phosphorylierung der ERM-Proteine die Erklärung für eine fehlerhafte Polarisierung und Adhäsion Dynasore-behandelter T-Zellen sein, insbesondere da im Zebrafisch (*Danio rerio*) bereits ein regulierendes Einwirken von Dynamin auf die zelluläre Lokalisierung sowie die Phosphorylierung von epithelialem ERM beschrieben wurde [222]. Interessanterweise konnte jedoch durch die Zugabe von Dynasore zu humanen CD4⁺ T-Lymphozyten der Phosphorylierungsstatus von ERM nicht beeinflusst werden, weder in stimulierten noch unstimulierten Zellen (Abbildung 3.18). Dies spricht gegen die ERM-Proteine als Verbindungsglieder zwischen Dynamin2 und der Adhäsion sowie Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zellen.

Ein weiterer bekannter Regulator der Adhäsion und auch der Polarisierung von Lymphozyten ist die kleine GTPase Rap1, welche eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Integrinen einnimmt [15, 182]. So spielt sie eine entscheidende Funktion bei der *inside-out* Integrin-Aktivierung über unterschiedlichste Stimulanzen und Signalwege, zu denen auch Signalkaskaden induziert durch den TCR, Chemokine sowie PMA gehören [223, 224, 225]. Eine ineffiziente Aktivierung von Rap1 hätte somit fatale Folgen für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ruhende CD4⁺ T-Zellen, welche entweder mit Inhibitoren der Dynamin2 GTPase-Aktivität versetzt worden waren oder deren Dynamin2-Expression durch die Transfektion mit Dynamin2-spezifischen siRNAs massiv herunterreguliert worden war, eine stark beeinträchtigte PMA-induzierte Aktivierung von Rap1 aufwiesen (Abbildungen 3.19 und 3.20). Auch die TCR-stimulierte Rap1-Aktivierung in ruhenden CD4⁺ T-Zellen war stark beeinträchtigt nach der Zugabe von Dynasore (Abbildung 3.21). Dies zeigt deutlich, dass Dynamin2 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 spielt. Im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen weisen aktivierte Effektor-T-Zellen ein hohes basales Aktivierungslevel an Rap1 auf [183]. Da auch diese Art der Rap1-Aktivierung, welche nicht durch einen direkt zuvor hinzugegeben Stimulus erzeugt

wird, sensitiv gegenüber der Inhibition von Dynamin2 war (Abbildung 3.21), kann davon ausgegangen werden, dass Dynamin2 nicht nur von großer Wichtigkeit für die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1, sondern zudem auch für die Stimulus-unabhängige Aufrechterhaltung der zellulären Rap1-GTP-Level verantwortlich ist. Zu diesem Befund passt zudem, dass die hohe basale Integrin-vermittelte Adhäsion sowie Migration auf 2-dimensionalen Oberflächen, welche bei Effektor-T-Zellen zu beobachten ist, ebenfalls stark durch die Inhibition von Dynamin2 beeinflusst wird (Abbildung 3.4 und 3.22).

Obwohl die fehlerhafte Aktivierung von Rap1 in Dynamin2-defizienten Zellen deren stark reduzierte Adhäsion und Polarisierung erklären könnte, stellt sich die Frage, ob Rap1 tatsächlich die Verbindung zwischen Dynamin2 und diesen Phänotypen darstellt. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Rap1a-eGFP Fusionsproteine in primären CD4⁺ T-Zellen überexprimiert und deren PMA-stimulierte Adhäsion mit und ohne Zugabe von Dynasore analysiert. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass die fehlerhafte Aktivierung von Rap1 in T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 für deren Adhäsionsdefizite verantwortlich ist, da die Überexpression von Rap1a-eGFP Wildtyp sowie der konstitutiv aktiven Punktmutante Rap1a-eGFP G12V die Integrin-vermittelte Adhäsion Dynasore-behandelter T-Zellen wiederherstellen konnte, während die Überexpression von eGFP alleine keinen Effekt auf diese hatte (Abbildung 3.23). Dass nicht nur die konstitutiv aktive Punktmutante sondern auch die Wildtyp-Variante von Rap1a dazu in der Lage waren, lässt sich dadurch erklären, dass beide Fusionsproteine nach der Überexpression in aktiviertem Zustand vorlagen. Dieser war, im Gegensatz zum Aktivierungszustand von endogen exprimiertem Rap1, jedoch nicht abhängig von Dynamin2 (Abbildung 3.23). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die transiente Überexpression selbst sein, welche zu einer hohen Konzentration des Proteins von Interesse führt und somit auch Einfluss auf dessen Aktivität nehmen kann [226]. Interessanterweise führte jedoch die alleinige Aktivierung von Rap1a nur durch dessen Überexpression und ohne die zusätzliche Stimulation mit PMA zu keiner effizienten Adhäsion von T-Zellen. Dies spricht dafür, dass neben der Aktivierung von Rap1 auch weitere, Dynamin2-unabhängige Prozesse nötig sind, um die Adhäsion von T-Lymphozyten zu gewährleisten. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass der Einfluss von Dynamin2 auf die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Lymphozyten über die Regulation der Rap1-Aktivierung erfolgt.

4.4 Dynamin2 kontrolliert die Aktivität von Rap1 über FAK/Pyk2 und RapGEF1

Da bisher eindeutig gezeigt werden konnte, dass Dynamin2 über Rap1 die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Lymphozyten kontrolliert, stellt sich nun die Frage, wie

Dynamin2 die Aktivierung der kleinen GTPase regulieren kann. Da eine direkte Interaktion von Dynamin2 und Rap1 mittels Co-Immunpräzipitation nicht beobachtet werden konnte, ist eine unmittelbare Interaktion der Proteine als Erklärung hierfür sehr unwahrscheinlich (Abbildung 3.28). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die Lokalisation von Dynamin2-eGFP in *Cluster*-ähnliche Strukturen an der basalen Plasmamembran adhärenter und über den TCR aktivierter T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.2). Da dies der die Adhäsion vermittelnde Teil der Zelle ist, könnten diese Strukturen eng verbunden sein mit dem Einfluss von Dynamin2 auf die Adhäsion der Lymphozyten. Zudem wurde bereits beschrieben, dass Rap1 nach dessen Aktivierung an die Plasmamembran rekrutiert werden kann [227, 228] und auch mit dem endosomalen Kompartiment in Verbindung steht [229, 230]. Somit könnte es sich bei den Dynamin2-Akkumulationen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen eventuell um *Hotspots* der Endozytose handeln. Interessanterweise konnten aber weder Rap1a-RFP noch Marker für frühe Endosomen co-lokalisiert mit Dynamin2-eGFP in den eben erwähnten Strukturen gefunden werden (Abbildungen 3.29 und 3.24), was die zuvor aufgestellte Hypothese, dass eine fehlerhafte Endozytose nicht der Grund für die Adhäsionsdefizite von Dynamin2-defizienten Zellen ist, verstärkend unterstützt. Neben dem endosomalen können Rap1 und Dynamin2 zudem auch mit dem lysosomalen Kompartiment interagieren [186, 231]. Zudem ist bekannt, dass der lysosomale Abbau bestimmter Proteine für Mechanotransduktion sowie Adhäsion von Zellen, unter anderem von T-Lymphozyten, von großer Bedeutung ist, beispielsweise im Rahmen der Chaperon-unterstützten selektiven Autophagie [232]. Doch auch der lysosomale Marker LAMP1 lokalisierte nicht in die Dynamin2-eGFP-haltigen *Cluster* an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen, was einen direkten Zusammenhang von Lysosomen mit den Akkumulationen von Dynamin2-eGFP eher unwahrscheinlich macht (Abbildung 3.24).

In mesenchymalen Zellen, welche stark adhärenent sind und große Adhäsionsstrukturen ausbilden, wurde Dynamin2 bereits beim Abbau reifer Fokaladhäsionen impliziert, was auf dessen Rolle in der Endozytose beruht [121]. Obwohl Fokaladhäsionen von Lymphozyten nicht ausgebildet werden [22], keine Marker für frühe Endosomen co-lokalisiert mit Dynamin2-eGFP beobachtet werden konnten und auch die Dynamin2-unabhängige Inhibition der Endozytose nicht zu einem Verlust der Adhäsion von T-Zellen führte, sollte überprüft werden, ob Integrine oder entsprechende Adaptermoleküle in den Dynamin2-eGFP-*Clustern* an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen zu finden waren, nicht zuletzt da diese in ihrer Struktur an Adhäsionsstrukturen erinnerten. Da als Integrin-Ligand ICAM-1 verwendet worden war, wurde die Lokalisation von CD18, der β_2 -Integrin-Kette, analysiert. Interessanterweise konnte jedoch keine Co-Lokalisation des Integrins mit Dynamin2-eGFP beobachtet werden, obwohl auch CD18 in einem großen *Cluster* zu finden war, was auf die TCR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen zurückzuführen ist

[233]. Zudem co-lokalisierte auch Talin1, ein Adapterprotein, das für die Aktivierung aller Integrine essentiell ist und diese direkt binden kann [234], nicht mit Dynamin2-eGFP an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen (Abbildung 3.25). Die Beobachtung, dass auch das Tubulin-Zytoskelett nicht direkt mit dem Großteil der Dynamin2-eGFP-haltigen Strukturen assoziiert war (Abbildung 3.24), untermauert zusätzlich die Annahme, dass es sich bei den beobachteten Strukturen nicht um Adhäsionsstrukturen handelt welche über Dynamin2 umgesetzt werden, da alle von Dynamin2 abgebauten Fokaladhäsionen in mesenchymalen Zellen direkt von Mikrotubuli innerviert werden [117].

Die Tyrosinkinase FAK sowie das nah verwandte und in hämatopoetischen Zellen stark exprimierte Pyk2 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zelladhäsion und -migration [235]. Zudem wurde bereits beschrieben, dass in stark adhärenenten Zellen wie Fibroblasten, FAK und Pyk2 nach erfolgter Autophosphorylierung direkt mit Dynamin2 sowie mit Kinasen der Src-Familie (SFKs) interagieren können [118, 120]. Dies stimmt mit der in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtung überein, dass SFKs sowie FAK und Pyk2, jeweils im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand, stark und spezifisch mit Dynamin2-eGFP in den *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran von auf ICAM-1 adhärenenten T-Zellen co-lokalisieren (Abbildung 3.26). Die Autophosphorylierung und Aktivierung von FAK und Pyk2 kann über verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden, welche in T-Zellen die Signalgebung durch den TCR oder auch durch Chemokinrezeptoren beinhalten [189]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass genau diese Autophosphorylierungen von FAK und Pyk2, welche eine Grundvoraussetzung für deren Komplexbildung mit SFKs und Dynamin2 sind [118], stark von der Dynamin2 GTPase-Aktivität abhängen (Abbildung 3.27). Dies bedeutet wiederum auch, dass die Bildung des gesamten Komplexes an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen von Dynamin2 reguliert wird.

Neben den bereits beschriebenen Signalmolekülen konnte zudem ein weiteres Protein innerhalb der Dynamin2-eGFP-reichen *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen gefunden werden, bei dem es sich um RapGEF1 (auch bekannt als C3G) handelt (Abbildung 3.29). RapGEF1 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellmigration und -adhäsion und vermittelt zudem als wichtiges GEF für Rap1 dessen Aktivierung [236]. Wird RapGEF1 an Tyrosin504 phosphoryliert, wird es aktiviert und somit dessen GEF-Aktivität für Rap1 massiv erhöht [58]. Interessanterweise konnte RapGEF1, welches exakt an dieser Stelle phosphoryliert war, spezifisch angereichert in den Dynamin2-eGFP-*Clustern* an der basalen Plasmamembran von adhärenenten und aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Dies stimmt mit einer bereits veröffentlichten Studie überein, dass RapGEF1 im Rahmen der Aktivierung und Adhäsion von T-Zellen an die Plasmamembran rekrutiert wird [237]. Die entsprechende Phosphorylierung von RapGEF1 an Tyrosin504 wird von aktivierten SFKs vermittelt

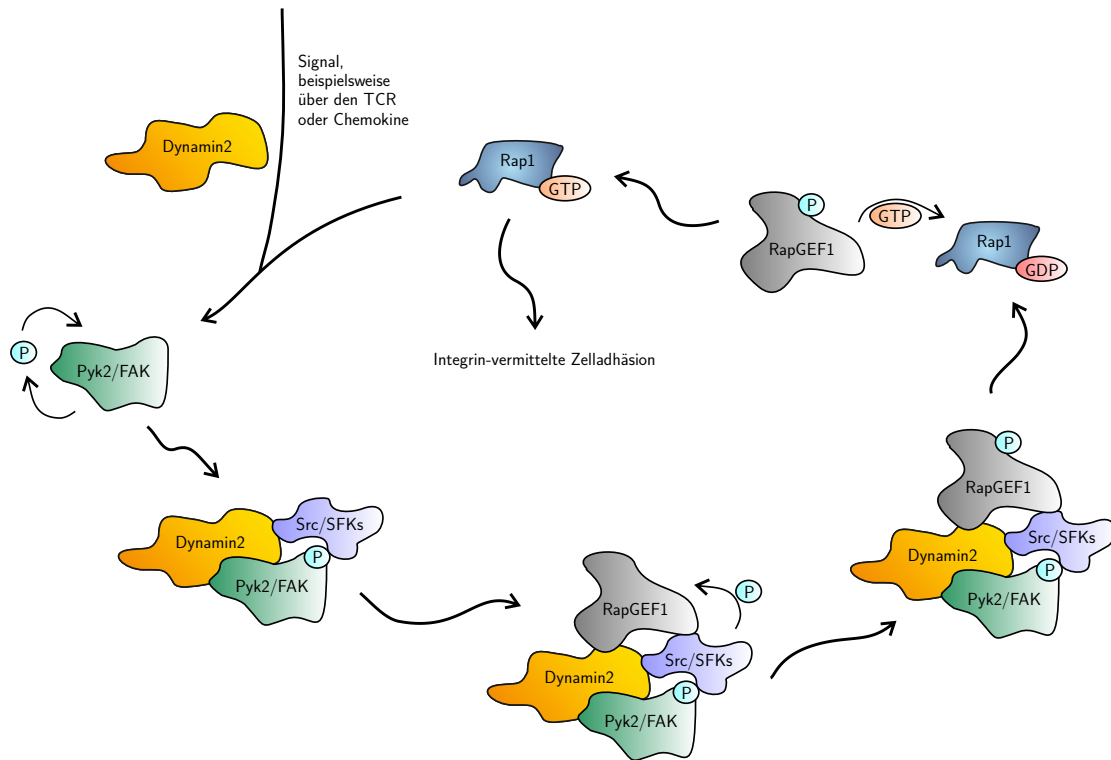


Abbildung 4.1: **Graphische Darstellung des Modells der Dynamin2-abhängigen Aktivierung von Rap1 über FAK/Pyk2 und RapGEF1.**

[59], welche sich ebenfalls in den *Cluster*-ähnlichen Strukturen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen befanden. So könnte die Rekrutierung von RapGEF1 in diese Strukturen zu einer Aktivierung des GEFs durch dort akkumulierte SFKs führen und wäre somit, wie auch die Entstehung der Komplexe, abhängig von Dynamin2. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die TCR-vermittelte Phosphorylierung von RapGEF1, welche zuvor bereits beschrieben wurde [238], durch die Zugabe des Dynamin2-Inhibitors Dynasore massiv gestört wurde (Abbildung 3.30). Da mittels Co-Immunpräzipitation keine direkte Interaktion von Dynamin2 und RapGEF1 nachgewiesen werden konnte, ist es eher unwahrscheinlich, dass Dynamin2 die Rekrutierung des GEFs in die Signalkomplexe an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen durch eine direkte Interaktion mit dem Protein vermittelt. Jedoch lag RapGEF1 in humanen T-Zellen direkt assoziiert mit den Adapterproteinen Crk-L und Grb2 vor (Abbildung 3.28), welche das Protein an die Plasmamembran rekrutieren und dadurch dessen Aktivierung einleiten können [58]. Zudem wurden Crk-L und Grb2 bereits als direkte Interaktoren von Dynamin2 beschrieben [107].

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen folgende Hypothese ableiten (Abbildung 4.1): Dynamin2 reguliert die Aktivierung der Tyrosinkinasen FAK und Pyk2, welche

durch unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden kann und durch eine Autophosphorylierung der Kinasen erfolgt. Nach ihrer Aktivierung binden dann FAK und Pyk2 an Dynamin2 sowie SFKs und bilden mit diesen einen Signalkomplex an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen aus. RapGEF1 wird ebenfalls in diesen Komplex rekrutiert, möglicherweise über dessen Interaktion mit Crk-L und Grb2. Innerhalb des Komplexes phosphorylieren SFKs RapGEF1 an Tyrosin504 und aktivieren somit dessen GEF-Aktivität gegenüber Rap1. RapGEF1 wiederum vermittelt an Rap1 daraufhin einen Austausch von GDP zu GTP und aktiviert somit die kleine GTPase, vermutlich jedoch außerhalb der beschriebenen Signalkomplexe, da Rap1 in diesen nicht nachgewiesen werden konnte. Rap1-GTP kann daraufhin mit verschiedenen Effektor-Proteinen interagieren und somit die T-Zelladhäsion über die Aktivierung von Integrinen induzieren. Zudem könnte eine positive Rückkopplungsschleife entstehen, da nicht nur Src, FAK und Pyk2 als wichtige Regulatoren der Aktivierung von Rap1 beschrieben wurden [239, 240, 241], sondern auch Rap1-GTP bereits in der Aktivierung von FAK und Pyk2 impliziert wurde [242, 243].

4.5 Dynamin2 hat eine duale Funktion im Rahmen der T-Zelladhäsion und -aktivierung

Dynamin2 würde nach dem oben beschriebenen Modell (Abbildung 4.1) eine zentrale Rolle in der Organisation der Signaltransduktionsplattformen an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen zukommen. Diese Komplexe wurden bereits innerhalb der ersten 5 min nach dem Aussäen der T-Zellen auf die mit ICAM-1 sowie aktivierenden α -CD3/ α -CD28-Antikörpern beschichteten Oberfläche beobachtet. Da T-Zellen, welche über keine Dynamin2-Aktivität verfügen, generell nicht mehr adhäreren können, konnte die Ausbildung dieser Strukturen während der Adhäsion nicht in bereits mit Dynasore behandelten Lymphozyten analysiert werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Dynasore auf die Dynamik von Dynamin2-eGFP innerhalb der Signalkomplexe analysiert, nachdem diese schon ausgebildet worden waren. In der Tat konnte so gezeigt werden, dass die chemische Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität zu einer starken Reduzierung der Mobilität von Dynamin2-eGFP innerhalb dieser Signalkomplexe führte, was die Rolle der großen GTPase in die Regulation der Dynamik dieser Strukturen zusätzlich untermauert (Abbildung 3.31).

Während des Verlaufs der TCR-induzierten Integrin-vermittelten Adhäsion durchläuft eine T-Zelle verschiedene morphologische Stadien. Nach der Stimulation über den TCR erfolgt die Adhäsion der Zelle, welche schnell stattfindet und mit einem Ausbreiten der Zelle einhergeht. Im Verlauf des Adhäsionsprozesses über mehrere Stunden zieht sich die Zelle

dann allmählich wieder zusammen. Dieser Prozess ist mit einem zentripetalen retrograden Aktin-Fluss verbunden, welcher unter anderem die Ausbildung der immunologischen Synapse zur Folge hat [210, 244, 245, 246]. Exakt diese Prozesse konnten auch in dem hier verwendeten System nachgewiesen werden, wobei neben dem F-Aktin-Zytoskelett auch Dynamin2-eGFP einer zentripetalen retrograden Umverteilung ausgesetzt war, was schließlich im Laufe der Adhäsion über mehrere Stunden zu einer Auflösung der eher peripher liegenden Signalkomplexe und der Entstehung eines großen zentralen *Clusters* von Dynamin2-eGFP führte (Abbildung 3.32). Innerhalb der zentralen *Cluster*, welche wesentlich langlebiger und stabiler waren als die initial gebildeten peripheren *Cluster*, wies Dynamin2-eGFP eine wesentlich geringere Mobilität auf (Abbildung 3.33). Zudem konnten dort weder FAK, Pyk2 noch RapGEF1 im aktivierten Zustand nachgewiesen werden (Abbildung 3.34). Die veränderte Dynamik von Dynamin2-eGFP, das Fehlen essentieller Signalmoleküle sowie die unterschiedliche Architektur und Lokalisierung an der Plasmamembran sprechen somit dafür, dass es sich bei den wesentlich später entstehenden zentralen Dynamin2-eGFP-*Clustern* im Vergleich zu den anfänglich gebildeten peripher liegenden Signalkomplexen um funktionell unterschiedliche Strukturen handelt. Während letztere, wie bereits gezeigt, die Signaltransduktion hin zu der Aktivierung von Integrinen und somit Zellausbreitung und -adhäsion regulieren, könnten die zentralen *Cluster*, nicht zuletzt auf Grund ihrer Lokalisation und Architektur, Bestandteile der immunologischen Synapse sein [247]. Dies passt zu bereits beschriebenen Funktionen von Dynamin2 in der T-Zellaktivierung durch die Regulation der F-Aktin-Polymerisierung in der immunologischen Synapse sowie der langanhaltenden Aufrechterhaltung der TCR-Signalgebung von endosomalen Kompartimenten aus [107, 122]. Dementsprechend wäre die Rolle von Dynamin2 in diesen Prozessen, welche auf den bereits etablierten und beschriebenen Funktionen von Dynamin2 in der Regulation von F-Aktin-Polymerisierung und Endozytose beruhen und erst nach der Zelladhäsion auftreten, zeitlich und funktionell zu unterscheiden von der initialen Rolle der großen GTPase in der Rap1-vermittelten T-Lymphozytenadhäsion.

4.6 Die Valenz, jedoch nicht die Affinität von Integrinen, wird durch Dynamin2 reguliert

Da in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden konnte, dass Dynamin2 über die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 großen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Adhäsion humaner T-Lymphozyten nimmt, stellt sich nun die Frage, wie sich die Dynamin2-vermittelte Aktivierung von Rap1 auf die Integrine selbst auswirkt. Wie bereits erwähnt wurde, konnte trotz der im Rahmen des Abbaus von Fokaladhäsionen beschriebenen

Funktion von Dynamin2, Integrine zu internalisieren [248], kein Effekt einer Inhibition der Dynamin2 GTPase-Aktivität auf die Oberflächenexpression ruhender und aktivierter $CD4^+$ T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.35). Dies und die Tatsache, dass Dynamin2-unabhängige Inhibitoren des intrazellulären Vesikeltransports und der Endozytose keinen Einfluss auf die statische Adhäsion humaner T-Zellen hatten (Abbildung 3.12), macht es sehr unwahrscheinlich, dass die große GTPase sich über eine fehlerhafte Internalisierung von Integrinen auf die T-Zelladhäsion auswirkt. So ist es viel wahrscheinlicher, dass Dynamin2 über Rap1 die Aktivierung von Integrinen beeinflussen kann.

Die präzisen Mechanismen, welche der Aktivierung von Integrinen zu Grunde liegen, werden seit langer Zeit intensiv und mit vielen verschiedenen Zellmodellen studiert [15, 40, 42]. Generell kann die Aktivität von Integrinen auf zwei verschiedenen Wegen moduliert werden. Zum einen über strukturelle Konformationsänderungen der Integrin-Moleküle selbst, welche entsprechende Bindungsstellen besser zugänglich machen und somit die Affinität für ihre Liganden erhöhen. Zum anderen kann aber auch das *Clustering* der Integrine in der Plasmamembran reguliert werden, was starke multimere Bindungen an Integrin-Liganden zur Folge hat und als Valenzregulation beschrieben wird [33]. Während gut etabliert ist, dass die wichtigen Integrin-aktivierenden Adaptoren Talin1 und Kindlin3 die Integrin-Affinität regulieren [234, 249, 250], ist der exakte Beitrag von Rap1 zu der Aktivierung von Integrinen weitaus weniger eindeutig. Manche Studien beschreiben die Rolle von Rap1 in diesem Prozess ebenfalls in der Regulation der Integrin-Affinität [243, 251, 252, 253], andere Veröffentlichungen implizieren Rap1 sowohl in der Affinitäts- als auch der Valenzregulation von Integrinen [238, 254], und wieder andere verbinden Rap1 exklusiv mit der Integrin-Valenz [53, 67, 255]. Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass in den Studien teilweise unterschiedliche Modellsysteme verwendet wurden und Rap1-GTP zudem auch über eine Vielzahl von verschiedenen Effektor-Molekülen Einfluss auf die Aktivität von Integrinen nehmen kann, welche teilweise gewebespezifisch exprimiert werden [256]. So konnte beispielsweise in einer Reihe von *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass der Komplex aus Rap1-GTP und dem Effektor RIAM den universellen Integrin-Aktivator Talin1 an das Thrombozyten-spezifische Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ rekrutieren und dieses somit aktivieren kann [72, 73, 74]. Überraschenderweise wiesen jedoch Thrombozyten aus Mäusen, in denen RIAM genetisch deletiert worden war, normale Integrin-Funktionen auf, was wiederum zeigt, dass RIAM-unabhängige Mechanismen der Integrin-Aktivierung existieren [257]. Allerdings konnte in weiteren *in vivo*-Studien beobachtet werden, dass RIAM eine wichtige Rolle bei der Integrin-Aktivierung auf Leukozyten und somit bei deren Dynamik innerhalb des Körpers spielt [258, 259]. Neben RIAM ist ein weiterer sehr wichtiger Rap1-Effektor im Bezug auf die Regulation der Integrin-Aktivierung das Protein RapL, welches besonders stark in Lymphozyten angereichert ist. Im Gegensatz zu RIAM wurde für den Rap1-GTP-RapL-

Komplex, der direkt an den zytoplasmatischen Teil der Integrin- α -Kette binden kann [71], vor allem eine wichtige regulatorische Rolle in der Integrin-Valenz, also dem *Clustering* von Integrinen, sowie der Polarisierung von Lymphozyten beschrieben [62, 64, 70]. Dies verdeutlicht, dass Rap1-GTP je nach Zelltyp und interagierendem Effektor-Protein die Aktivität von Integrinen auf sehr unterschiedliche Art und Weise beeinflussen kann.

Um zu analysieren, ob sich die Dynamin2-vermittelte Rap1-Aktivierung in humanen CD4⁺ T-Zellen auf die Affinitätsregulation von Integrinen auswirken könnte, wurden in der vorliegenden Arbeit monoklonale Reporter-Antikörper verwendet, welche spezifisch an nur in bestimmten Konformationen zugängliche Aktivierungsepitope auf Integrinen binden [260]. Überraschenderweise konnte jedoch in Dynasore-behandelten T-Zellen keine fehlerhafte Ausbildung entsprechender Aktivierungsepitope auf β_1 - und β_2 -Integrinen nach Stimulation mit PMA oder Mn²⁺-Ionen beobachtet werden, was gegen eine fehlerhafte Affinitätsregulation der Integrine in diesen Zellen spricht (Abbildungen 3.36 und 3.37). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem bereits veröffentlichten Befund, dass die Expression von Integrin-Aktivierungs-Epitopen und somit deren Affinitätsregulation nicht in allen zellulären Modellsystemen von der kleinen GTPase Rap1 abhängig ist [71]. Das heißt jedoch, dass Integrine auf T-Zellen, welche über kein aktives Dynamin2 verfügen, auf der einen Seite zwar keine eingeschränkte Affinität für ihre Liganden haben, auf der anderen Seite jedoch auch keine stabile Adhäsion vermitteln können. Das würde bedeuten, dass die reine Expression von Integrinen mit hoher Affinität für ihre Liganden nicht ausreicht, um eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion zu gewährleisten. Diese Theorie wird gestützt durch die Beobachtung, dass auch durch den Einsatz von KIM185 in Dynasore-behandelten Zellen keine effiziente Adhäsion auf ICAM-1 induziert werden konnte (Abbildung 3.38). KIM185 ist ein monoklonaler Antikörper, welcher alle β_2 -Integrine auf der Zelloberfläche unabhängig von deren Aktivierungszustand bindet, diese jedoch anschließend mechanisch, das heißt ohne den Beitrag intrazellulärer Signalkaskaden, in eine Konformation hoher Affinität versetzt. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde bereits zuvor beschrieben, dass eben diese KIM185-induzierte Adhäsion von Lymphozyten auf ICAM-1 auch von der Aktivität der kleinen GTPase Rap1 abhängig ist [261]. Somit konnte hier gezeigt werden, dass die Inhibition der Dynamin2-vermittelten Aktivierung von Rap1 keinen Effekt auf die Affinität von Integrinen hat, Integrine hoher Affinität für ihre Liganden jedoch nicht alleinig ausreichend sind um eine stabile Zelladhäsion zu vermitteln.

Wie bereits beschrieben, können Integrine neben ihrer Affinität auch über ihre Valenz, also dem *Clustering*, in ihrer Aktivität reguliert werden. Dieser Mechanismus ist im Vergleich zu der Affinitätsregulation jedoch wesentlich weniger gut verstanden [44]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit tatsächlich ein starker Einfluss von Dynamin2 auf die Integrin-Valenz nachgewiesen werden. In unstimulierten ruhenden CD4⁺

T-Zellen in Suspension wurde eine massive Reduktion von vorgebildeten CD18-*Clustern* auf der Oberfläche Dynasore-behandelter T-Zellen beobachtet (Abbildung 3.39). Auch die durch aktivierende α -CD3/ α -CD28-Antikörper stimulierte Entstehung einer großen β_2 -Integrin-Akkumulation an der basalen Plasmamembran von auf ICAM-1 adhärenen T-Zellen wurde durch die chemische Inhibition von Dynamin2 komplett gestoppt (Abbildung 3.40). Diese Ergebnisse zeigen, dass Dynamin2 die Integrin-Valenz vor und nach dem Kontakt mit Integrin-Liganden kontrolliert, was in einer positiven Rückkopplungsschleife resultieren könnte, da die hierbei beteiligten Kinasen der Src-Familie sowie FAK und Pyk2 auch durch die *outside-in* Signalgebung von Integrinen aktiviert werden können [262].

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass KIM185-gebundene β_2 -Integrine, welche sich somit in einer Konformation hoher Affinität für ihre Liganden befanden, ebenfalls große *Cluster* ausbildeten, welche in polarisierten T-Lymphozyten in den Uropod lokalisierten (Abbildung 3.41). Diese Struktur am Hinterende polarisierter amöboider Zellen, welche auch wichtige Funktionen in der Regulation der Adhäsion hat [263], wurde jedoch ohne die Anwesenheit von funktionellem Dynamin2 in humanen T-Lymphozyten gar nicht mehr ausgebildet (Abbildung 3.14). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch das generelle *Clustering* von KIM185-gebundenen β_2 -Integrinen von Dynamin2 abhängig war (Abbildung 3.41). Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass auch KIM185 in Dynasore behandelten Zellen keine stabile Zelladhäsion auslösen konnte, da der Antikörper nicht nur die reine Bildung von Integrin-Epitopen hoher Affinität für ihre Liganden induziert, sondern auch die Valenz der Integrine erhöht, und somit die Zelladhäsion vermittelt. Während die Aktivierung der hohen Affinität mechanisch an der Zelloberfläche stattfindet, scheint das *Clustering* von KIM185-gebundenem CD18 auf intrazelluläre Prozesse angewiesen zu sein, welche die Integrin-Valenz regulieren. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, wird eben diese Integrin-Valenz von Dynamin2 kontrolliert, was den gesamten Prozess der Zelladhäsion von der großen GTPase abhängig macht. So reguliert Dynamin2 sehr wahrscheinlich über die Aktivierung von RapGEF-1 und somit auch Rap1 das *Clustering* von Integrinen und damit die Adhäsion von T-Lymphozyten. Interessanterweise wurde die RapGEF1-Rap1-Signalachse schon zuvor in der Kontrolle der T-Zelladhäsion eben durch die Regulation der Integrin-Valenz impliziert [61]. Dass Dynamin2 eine essenzielle Rolle in der Formation von Integrin-*Clustern* hat spricht zudem abermals gegen eine Beteiligung des F-Aktin-Zytoskeletts bei diesem Prozess. So wurde bereits beschrieben, dass die De-Polymerisierung von F-Aktin zu einem spontanen *Clustering* von Integrinen führen kann, welche auf Grund des Verlusts der Verankerung am Zytoskelett eine erhöhte Diffusion in der Plasmamembran aufweisen können [264]. Dass trotz des negativen Effektes der chemischen Inhibition von Dynamin2 auf die F-Aktin-Polymerisierung in Dynasore-behandelten T-Zellen der gegensätzliche Effekt eintritt, nämlich dass keine

Integrin-*Cluster* mehr gebildet werden können, unterstreicht daher die essentielle und F-Aktin-unabhängige Rolle von Dynamin2 in der Valenzregulation von Integrinen.

4.7 Fazit / Ausblick

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine wichtige und grundlegende Funktion der großen GTPase Dynamin2 in der Integrin-vermittelten Adhäsion von humanen CD4⁺ T-Zellen, welche durch verschiedene externe Stimuli induziert werden kann (Abbildung 4.2). Diese neue und hier erstmalig beschriebene Rolle des Proteins scheint unabhängig von dessen etablierten Funktionen in Membrandynamik sowie der Polymerisierung von F-Aktin zu sein. Vielmehr reguliert Dynamin2 die Adhäsion humaner T-Lymphozyten über die Aktivierung der kleinen GTPase Rap1, welche wiederum essentielle Funktionen in der Aktivierung von Integrinen hat. Dabei kontrolliert Dynamin2 die Aktivität von Rap1 sehr wahrscheinlich über die Organisation eines Signaltransduktionskomplexes an der basalen Plasmamembran adhärenter T-Zellen (Abbildung 4.1). Die große GTPase sorgt dabei für die Aktivierung der Tyrosinkinasen FAK und Pyk2, welche im aktivierten Zustand einen Komplex mit Kinasen der Src-Familie (SFKs) sowie Dynamin2 formen. Auch RapGEF1 wird in den Signaltransduktionskomplex rekrutiert, eventuell über die an dem GEF assoziierten Adapterproteine Crk-L und Grb2, welche ebenfalls Dynamin2 binden können. Innerhalb der Signalkomplexe phosphorylieren SFKs dann RapGEF1 an Tyrosin504, was eine massive Erhöhung von dessen GEF-Aktivität gegenüber Rap1 zur Folge hat. RapGEF1 vermittelt schließlich den Austausch von GDP zu GTP an Rap1, was die kleine GTPase aktiviert und mit entsprechenden Effektorproteinen interagieren lässt. Dies wirkt sich wiederum positiv auf die Aktivierung von Integrinen und die T-Zelladhäsion aus. Interessanterweise zeigt die soeben beschriebene Dynamin2-abhängige Signalgebung jedoch nur Einfluss auf die Integrin-Valenz, also die Formation von Integrin-*Clustern*, welche essentiell für eine stabile Zelladhäsion sind. Im Gegensatz dazu konnte jedoch kein Einfluss von Dynamin2 auf die Affinität einzelner Integrin-Moleküle für ihre Liganden beobachtet werden, was dafür spricht, dass diese durch eine Dynamin2-unabhängige Signalgebung reguliert wird.

Es ist interessant, dass sich die Dynamin2-abhängige Aktivierung von Rap1 anscheinend nur auf die Integrin-Valenz, jedoch nicht auf die Affinität der Zelladhäsionsmoleküle für ihre Liganden auswirkt. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass Dynamin2-abhängiges Rap1-GTP mit speziellen Effektoren interagiert, welche stärkeren Einfluss auf die Integrin-Valenz als auf die Integrin-Affinität haben. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre RapL, welches stark in Lymphozyten exprimiert wird und, im Gegensatz zu RIAM, vorzugsweise in der Regulation des Integrin-*Clusterings* und der Polarisie-

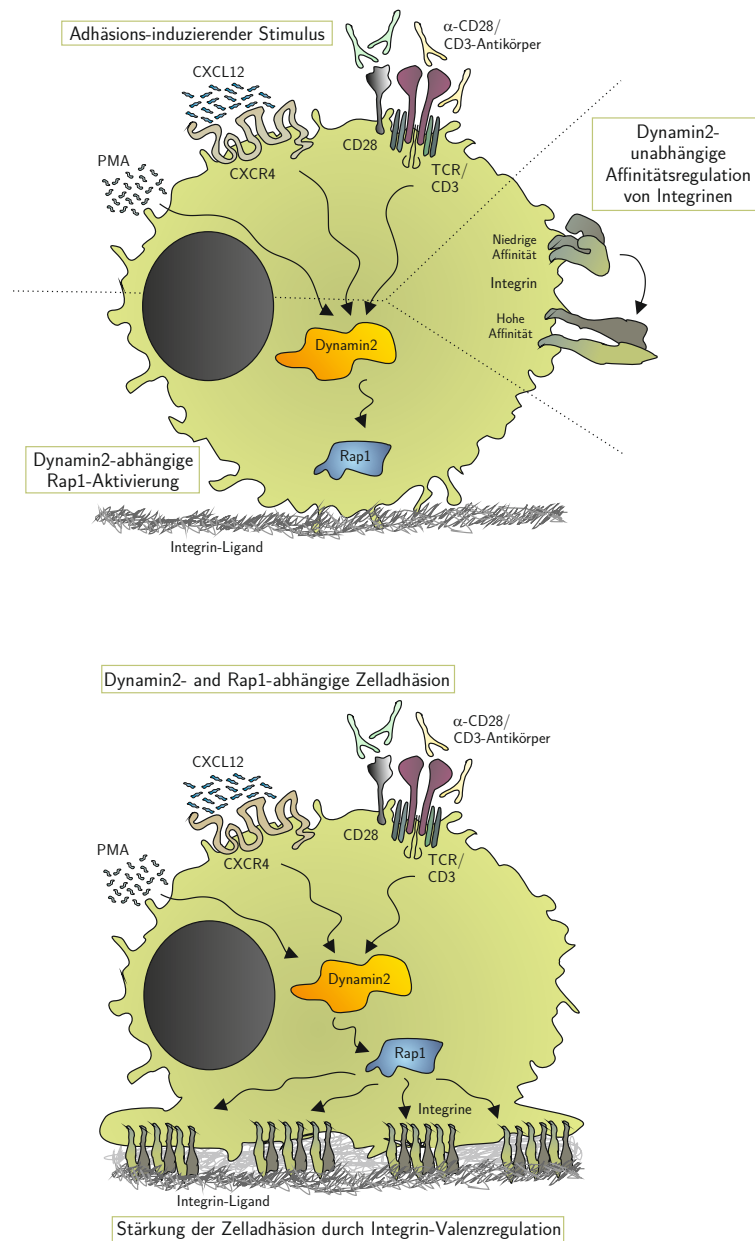


Abbildung 4.2: Graphische Darstellung des Modells der Dynamin2- und Rap1-abhängigen Integrin-vermittelten T-Zelladhäsion.

nung von T-Zellen beschrieben wurde [62, 64, 70]. Dies sind exakt die Prozesse, welche in humanen T-Zellen ohne funktionellem Dynamin2 beeinträchtigt sind. Es würde sich also anbieten, in zukünftigen Studien die Beteiligung von RapL bei der Dynamin2-abhängigen Lymphozyten-Adhäsion und Integrin-Valenzregulation genauer zu untersuchen. Zudem birgt Dynamin2 durch seine spezifische Rolle innerhalb der Regulation der Integrin-Aktivität auch großes Potential dazu beizutragen, die regulatorischen Mechanismen der Integrin-Valenz und -Affinität, welche in vielen Studien Hand in Hand gehen

und oft schwer zu unterscheiden sind, in Zukunft auf molekularer Ebene besser trennen, analysieren und verstehen zu können. Der genaue zellbiologische Vorgang des Dynamin2-abhängigen Integrin-*Clusterings* selbst ist bisher jedoch nicht ausreichend geklärt worden und erfordert weitere Experimente. So könnte beispielsweise mittels Einzelpartikelverfolgung untersucht werden, ob Dynamin2 die laterale Diffusion von Integrin-Molekülen innerhalb der Plasmamembran von T-Zellen beeinflussen kann, da diese zu der Bildung von Integrin-*Clustern* beitragen kann und durch das auch in der vorliegenden Arbeit häufig verwendete PMA stark erhöht wird [199].

Da in der vorliegenden Arbeit zwar vorzugsweise humane Primärzellen verwendet, aber ausschließlich *in vitro*-Studien durchgeführt wurden, stellt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz der hier erhaltenen Ergebnisse. Interessanterweise wurde bereits eine CD4-spezifische Dynamin2-*Knockout*-Maus generiert, welche in der Tat auch einen Phänotyp bezüglich des systemischen Verteilungsmusters von Thymozyten und reifen T-Zellen aufweist, welche nicht mehr effektiv aus lymphatischen Organen auswandern können [130]. Obwohl die Autoren der Veröffentlichung diesen Phänotyp auf eine defekte Sphingosin-1-phosphat induzierte Signalgebung zurückführen, wurde im Rahmen der Studie der Beitrag sowie die Funktion von Integrinen in Dynamin2-defizienten T-Zellen nicht analysiert. Es würde sich demnach anbieten, dieses Mausmodell oder auch die T-Zellen dieser Maus im Hinblick auf den hier beschriebenen Mechanismus zu analysieren.

Während Integrin-vermittelte Adhäsion und Migration von Lymphozyten auf der einen Seite extrem wichtig für die Homöostase und ein effektives Immunsystem sind, spielen diese Prozesse auf der anderen Seite auch eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn. So werden zur Behandlung der eben genannten Erkrankungen beispielsweise monoklonale Antikörper eingesetzt, welche die Lymphozyten-Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ targetieren und somit in ihrer Funktion inhibieren [133]. Doch auch Proteine, welche generell in der grundlegenden Regulation der Integrin-vermittelten Adhäsion impliziert und gemeinsam als Integrin-Adhäsom bezeichnet werden, rücken mehr und mehr in den Fokus der Therapeutika-Entwicklung [265]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse etablieren Dynamin2 nun im Integrin-Adhäsom von Lymphozyten und könnten auf lange Frist dazu beitragen, neue Therapeutika für die Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. Zudem könnte der hier beschriebene Zusammenhang von Dynamin2, Rap1 und Integrin-vermittelter Adhäsion auch in anderen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. So werden beispielsweise sowohl Dynamin2 als auch Rap1 mit einer erhöhten Metastasierung bestimmter Krebstypen in Verbindung gebracht [266, 267]. Es wäre somit durchaus denkbar, dass auch in bestimmten Krebszellen ein funktionaler Zusammenhang zwischen Dynamin2 und Rap1 besteht, welcher therapeutisch targetiert werden könnte, um die Integrin-vermittelte Migration und Invasion von

Tumorzellen zu inhibieren. Dementsprechend gibt es bereits erste Studien, welche die Möglichkeit des Einsatzes von spezifischen Inhibitoren für Dynamin2 im Rahmen dieses Prozesses untersuchen [268, 269].

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	DIC	<i>differential interference contrast</i>
α-	anti-	DMSO	Dimethylsulfoxid
μ	Mikro	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)	Drp1	<i>dynamamin-related protein 1</i>
Akt	Proteinkinase B	DTT	Dithiotreitol
APC	<i>antigen presenting cell</i>	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
BCA	Bicinchoninsäure	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BSA	Bovines Serum Albumin	EEA-1	<i>early endosome antigen 1</i>
BWL	Bindungs- /Wasch-/-Lyse	eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5	ER	Endoplasmatisches Retikulum
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
cDNA	komplementäre DNA	ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester	<i>et al.</i>	et alteres (lat.: und andere)
CH	konstante Domäne einer schweren Antikörperkette	FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation	F	Farad
Crk-L	<i>Crk-like protein</i>	FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>	F-Aktin	filamentöses Aktin
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12	FBS	<i>fetal bovine serum</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4	FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
DAG	Diacylglycerol	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
		g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

x g	x-fache Erdbeschleunigung	LAMP-1	<i>lysosomal-associated</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein		<i>membrane protein 1</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate</i> <i>dehydrogenase</i>	lat.	lateinisch
GDP	Guanosindiphosphat	LB	<i>lysogeny broth</i>
GED	GTPase-Effektor-Domäne	LFA-1	<i>leukocyte function antigen-1</i>
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange</i> <i>factor</i>	LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskopie</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound</i> <i>protein 2</i>	m	Meter; Milli
GST	Glutathion-S-Transferase	M	Molarität (mol/l)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	MACS	<i>magnetic-activated cell</i> <i>sorting</i>
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym	MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
h	Stunde	MIDAS	<i>metal-ion-dependent adhesion</i> <i>site</i>
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>	min	Minute
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-2-ethansulfonsäure	mol	Mol
HEV	hochendotheliale Venole	mRNA	<i>messenger RNA</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	Mst1	<i>mammalian STE20-like</i> <i>protein kinase 1</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>	m/v	Masse pro Volumen
Hz	Hertz	n	Nano, Anzahl von Versuchswiederholungen
ICAM	<i>intercellular adhesion</i> <i>molecule</i>	NK-Zelle	natürliche Killerzelle
IFN	Interferon	ns	nicht signifikant
IgG	Immunglobulin G	Opa1	<i>mitochondrial dynamin-like</i> <i>GTPase</i>
IL	Interleukin	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
kb	Kilobasen	Pak1	<i>p21 protein-activated kinase 1</i>
kDa	Kilodalton	PBD	P21 bindende domäne
Kit	kommerzielles Reaktionssystem	PBMC	<i>peripheral blood mononuclear</i> <i>cell</i>
l	Liter	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
LAD	Leukozyten-Adhäsions- Defizienz	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

Abkürzungsverzeichnis

PFA	Paraformaldehyd	s	Sekunde
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	S1P	Sphingosin-1-phosphat
PH	Pleckstrin Homologie	S1PR1	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1
PKC	Proteinkinase C	S.D.	<i>standard deviation</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	S.E.M.	<i>standard error of mean</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
PRD	Prolin-reiche Domäne	SFKs	<i>Src-family kinases</i>
Pyk2	<i>protein tyrosine kinase 2 beta</i>	SH	<i>Src-homology</i>
Rab5A	<i>Ras-related protein Rab5A</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	Src	<i>sarcoma, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
Rap1	<i>Ras-related protein 1</i>	TBST	<i>tris-buffered saline tween-20</i>
RapGEF	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor</i>	TCR	<i>T cell receptor</i>
RapL	<i>regulator of adhesion and polarization enriched in lymphocytes</i>	TEMED	Tetramethylethylenediamin
Ras	<i>rat sarcoma, G-protein Ras</i>	TLR	<i>toll-like receptor</i>
RBD	Rap bindende Domäne	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
rev	<i>reverse</i>	Tris	Tris- (hydroxymethyl)aminomethan
RFP	<i>red fluorescent protein</i>	TRITC	Tetramethylrhodamin
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i>	Us	Unstimuliert
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	USA	<i>United States of America</i>
RNAi	RNA-Interferenz	UV	Ultraviolett
rpm	<i>revolutions per minute</i>	V	Volt
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	Vav	<i>proto-oncogene vav</i>
rRNA	ribosomale RNA	VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
RT	Raumtemperatur	Vf	Verdünnungsfaktor
		VLA	<i>very late antigen</i>
		VLE	<i>very low endotoxin</i>
		v/v	Volumen pro Volumen
		WB	Western-Blot

Literaturverzeichnis

- [1] Kenneth P. Murphy, Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Allan Mowat, and Casey T. Weaver. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, London, 8th edition, 2012.
- [2] Xuetao Cao. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 16(1):35–50, 2016.
- [3] David G. Schatz and Yanhong Ji. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews. Immunology*, 11(4):251–263, 2011.
- [4] Stephen L. Nutt, Philip D. Hodgkin, David M. Tarlinton, and Lynn M. Corcoran. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews. Immunology*, 15(3):160–171, 2015.
- [5] Ian A. Parish and Susan M. Kaech. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 21(3):291–297, 2009.
- [6] Nathan D. Pennock, Jason T. White, Eric W. Cross, Elizabeth E. Cheney, Beth A. Tamburini, and Ross M. Kedl. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4):273–283, 2013.
- [7] Jean-Philippe Girard, Christine Moussion, and Reinhold Förster. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature Reviews. Immunology*, 12(11):762–773, 2012.
- [8] Sussan Nourshargh, Peter L. Hordijk, and Michael Sixt. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(5):366–378, 2010.
- [9] Marcia A. Munoz, Mate Biro, and Wolfgang Weninger. T cell migration in intact lymph nodes in vivo. *Current Opinion in Cell Biology*, 30:17–24, 2014.
- [10] Chang Gong, Jennifer J. Linderman, and Denise Kirschner. Harnessing the heterogeneity of T cell differentiation fate to fine-tune generation of effector and memory T cells. *Frontiers in Immunology*, 5:57, 2014.
- [11] Tim Worbs, Swantje I. Hammerschmidt, and Reinhold Förster. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 17(1):30–48, 2017.

- [12] Sussan Nourshargh and Ronen Alon. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41(5):694–707, 2014.
- [13] Barry M. Gumbiner. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3):345–357, 1996.
- [14] B. D. Angst, C. Marozzi, and A. I. Magee. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4):629–641, 2001.
- [15] Nancy Hogg, Irene Patzak, and Frances Willenbrock. The insider’s guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature Reviews. Immunology*, 11(6):416–426, 2011.
- [16] S. M. Frisch and H. Francis. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 124(4):619–626, 1994.
- [17] Ugo Cavallaro and Elisabetta Dejana. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(3):189–197, 2011.
- [18] Jean-Baptiste Michel. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(12):2146–2154, 2003.
- [19] Douglas A. Lauffenburger and Alan F. Horwitz. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*, 84(3):359–369, 1996.
- [20] J. V. Small, K. Anderson, and K. Rottner. Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Bioscience Reports*, 16(5):351–368, 1996.
- [21] Tim Lämmermann and Michael Sixt. Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5):636–644, 2009.
- [22] Peter Friedl and Bettina Weigelin. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature Immunology*, 9(9):960–969, 2008.
- [23] W. S. Haston, J. M. Shields, and P. C. Wilkinson. Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices. *The Journal of Cell Biology*, 92(3):747–752, 1982.
- [24] Peter Friedl, Frank Entschladen, Christoph Conrad, Bernd Niggemann, and Kurt S. Zänker. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *European Journal of Immunology*, 28(8):2331–2343, 1998.
- [25] Tim Lämmermann, Bernhard L. Bader, Susan J. Monkley, Tim Worbs, Roland Wedlich-Söldner, Karin Hirsch, Markus Keller, Reinhold Förster, David R. Crit-

- chley, Reinhard Fässler, and Michael Sixt. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191):51–55, 2008.
- [26] Jörg Renkawitz, Kathrin Schumann, Michele Weber, Tim Lämmermann, Holger Pfflicke, Matthieu Piel, Julien Polleux, Joachim P. Spatz, and Michael Sixt. Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nature Cell Biology*, 11(12):1438–1443, 2009.
- [27] Verena Niggli. Insights into the mechanism for dictating polarity in migrating T-cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 312:201–270, 2014.
- [28] Milka Sarris and Michael Sixt. Navigating in tissue mazes: chemoattractant interpretation in complex environments. *Current Opinion in Cell Biology*, 36:93–102, 2015.
- [29] Tanya N. Mayadas, Robert C. Johnson, Helen Rayburn, Richard O. Hynes, and Denisa D. Wagner. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*, 74(3):541–554, 1993.
- [30] Jan Herter and Alexander Zarbock. Integrin regulation during leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology*, 190(9):4451–4457, 2013.
- [31] Mark S. Johnson, Ning Lu, Konstantin Denessiouk, Jyrki Heino, and Donald Gullberg. Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4):779–789, 2009.
- [32] Iain D. Campbell and Martin J. Humphries. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 2011.
- [33] Tatsuo Kinashi. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews. Immunology*, 5(7):546–559, 2005.
- [34] Bo Shen, M. Keegan Delaney, and Xiaoping Du. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5):600–606, 2012.
- [35] Clare L. Abram and Clifford A. Lowell. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annual Review of Immunology*, 27:339–362, 2009.
- [36] Nancy Hogg and Paul A. Bates. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biology*, 19(3):211–222, 2000.
- [37] Emanuel Rognoni, Raphael Ruppert, and Reinhard Fässler. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of Cell Science*, 129(1):17–27, 2016.
- [38] Tatsuo Kinashi. Overview of integrin signaling in the immune system. *Methods in Molecular Biology*, 757:261–278, 2012.

- [39] Xing Wu, Tao Yu, Daniel C. Bullard, and Dennis F. Kucik. SDF-1alpha (CXCL12) regulation of lateral mobility contributes to activation of LFA-1 adhesion. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(6):C666–72, 2012.
- [40] Ronen Alon and Sara W. Feigelson. Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5):670–676, 2012.
- [41] Brandon J. Burbach, Ricardo B. Medeiros, Kristen L. Mueller, and Yoji Shimizu. T-cell receptor signaling to integrins. *Immunological Reviews*, 218:65–81, 2007.
- [42] Sanford J. Shattil, Chungho Kim, and Mark H. Ginsberg. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4):288–300, 2010.
- [43] Motomu Shimaoka, Tsan Xiao, Jin-Huan Liu, Yuting Yang, Yicheng Dong, Chang-Duk Jun, Alison McCormack, Rongguang Zhang, Andrzej Joachimiak, Junichi Takagi, Jia-Huai Wang, and Timothy A. Springer. Structures of the alphaL I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, 112(1):99–111, 2003.
- [44] Daniel V. Iwamoto and David A. Calderwood. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, 36:41–47, 2015.
- [45] Jieqing Zhu, Jianghai Zhu, and Timothy A. Springer. Complete integrin headpiece opening in eight steps. *The Journal of Cell Biology*, 201(7):1053–1068, 2013.
- [46] Timothy A. Springer and Michael L. Dustin. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(1):107–115, 2012.
- [47] M. Amin Arnaout. Biology and structure of leukocyte beta 2 integrins and their role in inflammation. *F1000Research*, 5, 2016.
- [48] Gianfranco Bazzoni and Martin E. Hemler. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1):30–34, 1998.
- [49] Christopher V. Carman and Timothy A. Springer. Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5):547–556, 2003.
- [50] Mark H. Ginsberg. Integrin activation. *BMB Reports*, 47(12):655–659, 2014.
- [51] Kayoko Kinbara, Lawrence E. Goldfinger, Malene Hansen, Fan-Li Chou, and Mark H. Ginsberg. Ras GTPases: integrins’ friends or foes? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(10):767–776, 2003.

- [52] Y. Li, J. Yan, P. De, H.-C. Chang, A. Yamauchi, K. W. Christopherson, N. C. Paranevitan, X. Peng, C. Kim, V. Munugulavadla, R. Kapur, H. Chen, W. Shou, J. C. Stone, M. H. Kaplan, M. C. Dinauer, D. L. Durden, and L. A. Quilliam. Rap1a Null Mice Have Altered Myeloid Cell Functions Suggesting Distinct Roles for the Closely Related Rap1a and 1b Proteins. *The Journal of Immunology*, 179(12):8322–8331, 2007.
- [53] Marlena Duchniewicz, Tomasz Zemojtel, Mateusz Kolanczyk, Steffen Grossmann, Jürgen S. Scheele, and Fried J. T. Zwartkruis. Rap1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, 26(2):643–653, 2006.
- [54] H. Chu, A. Awasthi, G. C. White, M. Chrzanowska-Wodnicka, and S. Malarkannan. Rap1b Regulates B Cell Development, Homing, and T Cell-Dependent Humoral Immunity. *The Journal of Immunology*, 181(5):3373–3383, 2008.
- [55] E. W. Frische and F. J. T. Zwartkruis. Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases. *Developmental Biology*, 340(1):1–9, 2010.
- [56] Johannes L. Bos, Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5):865–877, 2007.
- [57] Martijn Gloerich and Johannes L. Bos. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends in Cell Biology*, 21(10):615–623, 2011.
- [58] Tamotsu Ichiba, Yuko Hashimoto, Mie Nakaya, Yasunobu Kuraishi, Shinya Tanaka, Takeshi Kurata, Naoki Mochizuki, and Michiyuki Matsuda. Activation of C3G Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rap1 by Phosphorylation of Tyrosine 504. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20):14376–14381, 1999.
- [59] Vegesna Radha, Ajumeera Rajanna, and Ghanshyam Swarup. Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton. *BMC Cell Biology*, 5:31, 2004.
- [60] Takaya Gotoh, Seisuke Hattori, Shun Nakamura, Hitoshi Kitayama, Makoto Noda, Yoshimi Takai, Kozo Kaibuchi, Hideki Matsui, Osamu Hatase, Hidehiro Takahashi, Takeshi Kurata, and Michiyuki Matsuda. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12):6746–6753, 1995.
- [61] Wenying Zhang, Yuan Shao, Deyu Fang, Jianyong Huang, Myung-Shin Jeon, and Yun-Cai Liu. Negative regulation of T cell antigen receptor-mediated Crk-L-C3G signaling and cell adhesion by Cbl-b. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26):23978–23983, 2003.

- [62] Koko Katagiri, Akito Maeda, Mika Shimonaka, and Tatsuo Kinashi. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nature Immunology*, 4(8):741–748, 2003.
- [63] Esther M. Lafuente, Andre A. F. L. van Puijenbroek, Matthias Krause, Christopher V. Carman, Gordon J. Freeman, Alla Berezovskaya, Erica Constantine, Timothy A. Springer, Frank B. Gertler, and Vassiliki A. Boussiotis. RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Developmental Cell*, 7(4):585–595, 2004.
- [64] Koko Katagiri, Masashi Imamura, and Tatsuo Kinashi. Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nature Immunology*, 7(9):919–928, 2006.
- [65] M. Spaargaren and J. R. Bischoff. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26):12609–12613, 1994.
- [66] Magdalena Chrzanowska-Wodnicka. Rap1 in endothelial biology. *Current Opinion in Hematology*, 24(3):248–255, 2017.
- [67] Eric Sebzda, Madelon Bracke, Tamara Tugal, Nancy Hogg, and Doreen Ann Cantrell. Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nature Immunology*, 3(3):251–258, 2002.
- [68] Frederic Lagarrigue, Chungho Kim, and Mark H. Ginsberg. The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood*, 128(4):479–487, 2016.
- [69] Yanbo Zhang and Hongyan Wang. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*, 135(4):268–275, 2012.
- [70] Koko Katagiri, Noriko Ohnishi, Kenji Kabashima, Tomonori Iyoda, Naoki Takeda, Yoichi Shinkai, Kayo Inaba, and Tatsuo Kinashi. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nature Immunology*, 5(10):1045–1051, 2004.
- [71] Yukihiro Ebisuno, Koko Katagiri, Tomoya Katakai, Yoshihiro Ueda, Tomomi Nemoto, Hiroyuki Inada, Junichi Nabekura, Takaharu Okada, Reiji Kannagi, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Nancy Hogg, and Tatsuo Kinashi. Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood*, 115(4):804–814, 2010.
- [72] Jaewon Han, Chinten James Lim, Naohide Watanabe, Alessandra Soriani, Boris Ratnikov, David A. Calderwood, Wilma Puzon-McLaughlin, Esther M. Lafuente,

- Vassiliki A. Boussiotis, Sanford J. Shattil, and Mark H. Ginsberg. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$. *Current Biology*, 16(18):1796–1806, 2006.
- [73] Naohide Watanabe, Laurent Bodin, Manjula Pandey, Matthias Krause, Shaun Coughlin, Vassiliki A. Boussiotis, Mark H. Ginsberg, and Sanford J. Shattil. Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$. *The Journal of Cell Biology*, 181(7):1211–1222, 2008.
- [74] Ho-Sup Lee, Chinten James Lim, Wilma Puzon-McLaughlin, Sanford J. Shattil, and Mark H. Ginsberg. RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(8):5119–5127, 2009.
- [75] Howard S. Shpetner and Richard B. Vallee. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, 59(3):421–432, 1989.
- [76] R. A. Obar, C. A. Collins, J. A. Hammarback, H. S. Shpetner, and R. B. Vallee. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature*, 347(6290):256–261, 1990.
- [77] A. M. van der Blik and E. M. Meyerowitz. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature*, 351(6325):411–414, 1991.
- [78] M. S. Chen, R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry, S. C. Wadsworth, and R. B. Vallee. Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature*, 351(6327):583–586, 1991.
- [79] H. Cao, F. Garcia, and M. A. McNiven. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9):2595–2609, 1998.
- [80] Shawn M. Ferguson and Pietro de Camilli. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(2):75–88, 2012.
- [81] Shawn M. Ferguson, Gabor Brasnjo, Mitsuko Hayashi, Markus Wolfel, Chiara Collesi, Silvia Giovedi, Andrea Raimondi, Liang-Wei Gong, Pablo Ariel, Summer Paradise, Eileen O’toole, Richard Flavell, Ottavio Cremona, Gero Miesenbock, Timothy A. Ryan, and Pietro de Camilli. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, 316(5824):570–574, 2007.
- [82] T. A. Cook, R. Urrutia, and M. A. McNiven. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2):644–648, 1994.

- [83] Andrea Raimondi, Shawn M. Ferguson, Xuelin Lou, Moritz Armbruster, Summer Paradise, Silvia Giovedi, Mirko Messa, Nao Kono, Junko Takasaki, Valentina Cappello, Eileen O'toole, Timothy A. Ryan, and Pietro de Camilli. Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, 70(6):1100–1114, 2011.
- [84] Ya-Wen Liu, Sylvia Neumann, Rajesh Ramachandran, Shawn M. Ferguson, Thomas J. Pucadyil, and Sandra L. Schmid. Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26):E234–42, 2011.
- [85] Benedikt Westermann. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12):872–884, 2010.
- [86] Raphael Gasper, Simon Meyer, Katja Gotthardt, Minhajuddin Sirajuddin, and Alfred Wittinghofer. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(6):423–429, 2009.
- [87] Joshua S. Chappie, Jason A. Mears, Shunming Fang, Marilyn Leonard, Sandra L. Schmid, Ronald A. Milligan, Jenny E. Hinshaw, and Fred Dyda. A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell*, 147(1):209–222, 2011.
- [88] Shawn M. Ferguson, Andrea Raimondi, Summer Paradise, Hongying Shen, Kumi Mesaki, Agnes Ferguson, Olivier Destaing, Genevieve Ko, Junko Takasaki, Ottavio Cremona, Eileen O' Toole, and Pietro de Camilli. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Developmental Cell*, 17(6):811–822, 2009.
- [89] Katja Faelber, York Posor, Song Gao, Martin Held, Yvette Roske, Dennis Schulze, Volker Haucke, Frank Noe, and Oliver Daumke. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*, 477(7366):556–560, 2011.
- [90] Marijn G. J. Ford, Simon Jenni, and Jodi Nunnari. The crystal structure of dynamin. *Nature*, 477(7366):561–566, 2011.
- [91] Rajesh Ramachandran, Mark Surka, Joshua S. Chappie, Douglas M. Fowler, Ted R. Foss, Byeong Doo Song, and Sandra L. Schmid. The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *The EMBO Journal*, 26(2):559–566, 2007.
- [92] S. Sever, A. B. Muhlberg, and S. L. Schmid. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 398(6727):481–486, 1999.

- [93] Y. Vallis, P. Wigge, B. Marks, P. R. Evans, and H. T. McMahon. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, 9(5):257–260, 1999.
- [94] J. R. Henley, E. W. Krueger, B. J. Oswald, and M. A. McNiven. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of Cell Biology*, 141(1):85–99, 1998.
- [95] S. M. Jones, K. E. Howell, J. R. Henley, H. Cao, and M. A. McNiven. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*, 279(5350):573–577, 1998.
- [96] Marcus J. Taylor, David Perrais, and Christien J. Merrifield. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biology*, 9(3):e1000604, 2011.
- [97] J. E. Hinshaw and S. L. Schmid. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374(6518):190–192, 1995.
- [98] M. H. Stowell, B. Marks, P. Wigge, and H. T. McMahon. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biology*, 1(1):27–32, 1999.
- [99] Aurelien Roux, Katherine Uyhazi, Adam Frost, and Pietro de Camilli. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441(7092):528–531, 2006.
- [100] Thomas J. Pucadyil and Sandra L. Schmid. Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell*, 135(7):1263–1275, 2008.
- [101] Agnieszka Collins, Anthony Warrington, Kenneth A. Taylor, and Tatyana Svitkina. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, 21(14):1167–1175, 2011.
- [102] Changkyu Gu, Suma Yaddanapudi, Astrid Weins, Teresia Osborn, Jochen Reiser, Martin Pollak, John Hartwig, and Sanja Sever. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal*, 29(21):3593–3606, 2010.
- [103] M. M. Kessels, A. E. Engqvist-Goldstein, D. G. Drubin, and B. Qualmann. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *The Journal of Cell Biology*, 153(2):351–366, 2001.
- [104] Dorothy A. Schafer, Scott A. Weed, Derk Binns, Andrei V. Karginov, J. Thomas Parsons, and John A. Cooper. Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Current Biology*, 12(21):1852–1857, 2002.

- [105] Gunther Schlunck, Hanna Damke, William B. Kiosses, Nicole Rusk, Marc H. Symons, Clare M. Waterman-Storer, Sandra L. Schmid, and Martin Alexander Schwartz. Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Molecular Biology of the Cell*, 15(1):256–267, 2004.
- [106] Eugene W. Krueger, James D. Orth, Hong Cao, and Mark A. McNiven. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3):1085–1096, 2003.
- [107] Timothy S. Gomez, Michael J. Hamann, Sean McCarney, Doris N. Savoy, Casey M. Lubking, Michael P. Heldebrant, Christine M. Labno, David J. McKean, Mark A. McNiven, Janis K. Burkhardt, and Daniel D. Billadeau. Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nature Immunology*, 6(3):261–270, 2005.
- [108] Massimiliano Baldassarre, Arsenio Pompeo, Galina Beznoussenko, Claudia Castaldi, Salvatore Cortellino, Mark A. McNiven, Alberto Luini, and Roberto Buccione. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3):1074–1084, 2003.
- [109] Gian-Carlo Ochoa, Vladimir I. Slepnev, Lynn Neff, Niels Ringstad, Kohji Takei, Laurie Daniell, Warren Kim, Hong Cao, Mark McNiven, Roland Baron, and Pietro de Camilli. A Functional Link between Dynamin and the Actin Cytoskeleton at Podosomes. *The Journal of Cell Biology*, 150(2):377–390, 2000.
- [110] James D. Orth, E. W. Krueger, H. Cao, and Mark A. McNiven. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1):167–172, 2002.
- [111] Anne E. Kruchten and Mark A. McNiven. Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 9):1683–1690, 2006.
- [112] Hiroshi Yamada, Tetsuya Takeda, Hiroyuki Michiue, Tadashi Abe, and Kohji Takei. Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 49(3):877–886, 2016.
- [113] Gina L. Razidlo, Yu Wang, Jing Chen, Eugene W. Krueger, Daniel D. Billadeau, and Mark A. McNiven. Dynamin 2 potentiates invasive migration of pancreatic tumor cells through stabilization of the Rac1 GEF Vav1. *Developmental Cell*, 24(6):573–585, 2013.
- [114] Do-Seon Lim, Sang-Ryul Kim, Baik-Dong Choi, Soon-Jeong Jeong, Guanlin Wang, Hak-Kyun Kim, Byung-Hoon Kim, Jae-Hwan Goo, and Moon-Jin Jeong. Dyna-

- min II involves in cell migration and actin formation of NIH3T3 cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(1):690–695, 2012.
- [115] R. D. Eppinga, E. W. Krueger, S. G. Weller, L. Zhang, H. Cao, and M. A. McNiven. Increased expression of the large GTPase dynamin 2 potentiates metastatic migration and invasion of pancreatic ductal carcinoma. *Oncogene*, 31(10):1228–1241, 2012.
 - [116] Wen-Chung Tsai, Chih-Chin Hsu, Jong-Hwei S. Pang, Miao-Sui Lin, Ying-Hsun Chen, and Fang-Chen Liang. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte migration with up-regulation of dynamin II expression. *PloS One*, 7(5):e38235, 2012.
 - [117] Ellen J. Ezratty, Michael A. Partridge, and Gregg G. Gundersen. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature Cell Biology*, 7(6):581–590, 2005.
 - [118] Yu Wang, Hong Cao, Jing Chen, and Mark A. McNiven. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9):1529–1538, 2011.
 - [119] Angela Bruzzaniti, Lynn Neff, Archana Sanjay, William C. Horne, Pietro de Camilli, and Roland Baron. Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Molecular Biology of the Cell*, 16(7):3301–3313, 2005.
 - [120] Angela Bruzzaniti, Lynn Neff, Amanda Sandoval, Liping Du, William C. Horne, and Roland Baron. Dynamin reduces Pyk2 Y402 phosphorylation and SRC binding in osteoclasts. *Molecular and Cellular Biology*, 29(13):3644–3656, 2009.
 - [121] Laura Brinas, Stephane Vassilopoulos, Gisele Bonne, Pascale Guicheney, and Marc Bitoun. Role of dynamin 2 in the disassembly of focal adhesions. *Journal of Molecular Medicine*, 91(7):803–809, 2013.
 - [122] Tim Willinger, Matthew Staron, Shawn M. Ferguson, Pietro de Camilli, and Richard A. Flavell. Dynamin 2-dependent endocytosis sustains T-cell receptor signaling and drives metabolic reprogramming in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14):4423–4428, 2015.
 - [123] Berta Bosch, Boyan Grigorov, Jordi Senserrich, Bonaventura Clotet, Jean-Luc Darlix, Delphine Muriaux, and Jose A. Este. A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Research*, 80(2):185–193, 2008.

- [124] Richard O. Jacques, Shirley C. Mills, Paula Cazzonatto Zerwes, Feyisope O. Fagade, John E. Green, Scott Downham, Darren W. Sexton, and Anja Mueller. Dynamamin function is important for chemokine receptor-induced cell migration. *Cell Biochemistry and Function*, 33(6):407–414, 2015.
- [125] Stephan Züchner, Maher Noureddine, Marina Kennerson, Kristien Verhoeven, Kristl Claeys, Peter de Jonghe, John Merory, Sofia A. Oliveira, Marcy C. Speer, Judith E. Stenger, Gina Walizada, Danqing Zhu, Margaret A. Pericak-Vance, Garth Nicholson, Vincent Timmerman, and Jeffery M. Vance. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature Genetics*, 37(3):289–294, 2005.
- [126] Marc Bitoun, Svetlana Maugenre, Pierre-Yves Jeannet, Emmanuelle Lacene, Xavier Ferrer, Pascal Laforet, Jean-Jacques Martin, Jocelyn Laporte, Hanns Lochmüller, Alan H. Beggs, Michel Fardeau, Bruno Eymard, Norma B. Romero, and Pascale Guicheney. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genetics*, 37(11):1207–1209, 2005.
- [127] C. S. Tremblay, F. C. Brown, M. Collett, J. Saw, S. K. Chiu, S. E. Sonderegger, S. E. Lucas, R. Alserihi, N. Chau, M. L. Toribio, M. P. McCormack, M. Chircop, P. J. Robinson, S. M. Jane, and D. J. Curtis. Loss-of-function mutations of Dynamin 2 promote T-ALL by enhancing IL-7 signalling. *Leukemia*, 30(10):1993–2001, 2016.
- [128] Zheng Ge, Min Li, Gang Zhao, Lichan Xiao, Yan Gu, Xilian Zhou, Michael D. Yu, Jianyong Li, Sinisa Dovat, and Chunhua Song. Novel dynamin 2 mutations in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters*, 12(4):2746–2751, 2016.
- [129] Zheng Ge, Yan Gu, Qi Han, Gang Zhao, Min Li, Jianyong Li, Baoan Chen, Tianyu Sun, Sinisa Dovat, Robert Peter Gale, and Chunhua Song. Targeting High Dynamin-2 (DNM2) Expression by Restoring Ikaros Function in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Scientific Reports*, 6:38004, 2016.
- [130] Tim Willinger, Shawn M. Ferguson, Joao P. Pereira, Pietro de Camilli, and Richard A. Flavell. Dynamin 2-dependent endocytosis is required for sustained S1PR1 signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(4):685–700, 2014.
- [131] D. L. Brower, S. M. Brower, D. C. Hayward, and E. E. Ball. Molecular evolution of integrins: Genes encoding integrin subunits from a coral and a sponge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17):9182–9187, 1997.
- [132] Estelle S. Harris, Andrew S. Weyrich, and Guy A. Zimmerman. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Current Opinion in Hematology*, 20(1):16–25, 2013.

- [133] Klaus Ley, Jesus Rivera-Nieves, William J. Sandborn, and Sanford Shattil. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(3):173–183, 2016.
- [134] H. Feng, K. W. Liu, P. Guo, P. Zhang, T. Cheng, M. A. McNiven, G. R. Johnson, B. Hu, and S. Y. Cheng. Dynamin 2 mediates PDGFRalpha-SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion. *Oncogene*, 31(21):2691–2702, 2012.
- [135] Julia Riedl, Alvaro H. Crevenna, Kai Kessenbrock, Jerry Haochen Yu, Dorothee Neukirchen, Michal Bista, Frank Bradke, Dieter Jenne, Tad A. Holak, Zena Werb, Michael Sixt, and Roland Wedlich-Söldner. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods*, 5(7):605–607, 2008.
- [136] Chan R. Beals, Ana C. Edwards, Rebecca J. Gottschalk, Taco W. Kuijpers, and Donald E. Staunton. CD18 activation epitopes induced by leukocyte activation. *The Journal of Immunology*, 167(11):6113–6122, 2001.
- [137] Martyn K. Robinson, David Andrew, Hugh Rosen, Derek Brown, Susan Ortlepp, Paul Stephens, and Eugene C. Butcher. Antibody against the Leu-CAM beta-chain (CD18) promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion events. *The Journal of Immunology*, 148(4):1080–1085, 1992.
- [138] David Andrew, Anthony Shock, Elaine Ball, Susan Ortlepp, Joanne Bell, and Martyn Robinson. KIM185, a monoclonal antibody to CD18 which induces a change in the conformation of CD18 and promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion. *European Journal of Immunology*, 23(9):2217–2222, 1993.
- [139] Ian Dransfield, Carlos Cabañas, Alister Craig, and Nancy Hogg. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *The Journal of Cell Biology*, 116(1):219–226, 1992.
- [140] Alfonso Luque, Manuel Gomez, Wilma Puzon, Yoshikazu Takada, Francisco Sánchez-Madrid, and Carlos Cabañas. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(19):11067–11075, 1996.
- [141] Douglas Hanahan. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4):557–580, 1983.
- [142] F. C. Jensen, A. J. Girardi, R. V. Gilden, and H. Koprowski. Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52:53–59, 1964.

- [143] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1):59–74, 1977.
- [144] Ulrich Schneider, Hans-Ulrich Schwenk, and Georg Bornkamm. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5):621–626, 1977.
- [145] R. Higuchi, B. Krummel, and R. K. Saiki. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16(15):7351–7367, 1988.
- [146] Jean-Bernard Le Pecq and Claude Paoletti. A new fluorometric method for rna and dna determination. *Analytical Biochemistry*, 17(1):100–107, 1966.
- [147] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513–1523, 1979.
- [148] Roger Radloff, William Bauer, and Jerome. Vinograd. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(5):1514–1521, 1967.
- [149] Kenneth J. Livak, Susan J. Flood, Jeffrey Marmaro, William Giusti, and Karin. Deetz. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4(6):357–362, 1995.
- [150] Th. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [151] Thomas D. Schmittgen and Kenneth J. Livak. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6):1101–1108, 2008.
- [152] Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402–408, 2001.
- [153] Piotr Chomczynski and Nicoletta. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1):156–159, 1987.
- [154] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7):841–845, 1982.

- [155] U. Zimmermann. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta*, 694(3):227–277, 1982.
- [156] Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, and Craig C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [157] Mark J. Robertson, Fiona M. Deane, Phillip J. Robinson, and Adam McCluskey. Synthesis of Dynole 34-2, Dynole 2-24 and Dyngo 4a for investigating dynamin GTPase. *Nature Protocols*, 9(4):851–870, 2014.
- [158] Stephen. Boyden. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 115:453–466, 1962.
- [159] Peter Friedl and Eva-B. Brocker. Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking. *Methods in Molecular Biology*, 239:77–90, 2004.
- [160] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85, 1985.
- [161] Ulrich K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [162] Harry Towbin, Theophil Staehelin, and Julian. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4350–4354, 1979.
- [163] Felix J. Eppler, Thomas Quast, and Waldemar Kolanus. Dynamin2 controls Rap1 activation and integrin clustering in human T lymphocyte adhesion. *PloS One*, 12(3):e0172443, 2017.
- [164] Eric Macia, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner, and Tomas Kirchhausen. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell*, 10(6):839–850, 2006.
- [165] Ryan J. Park, Hongying Shen, Lijuan Liu, Xinran Liu, Shawn M. Ferguson, and Pietro de Camilli. Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 22):5305–5312, 2013.

- [166] Timothy A. Hill, Christopher P. Gordon, Andrew B. McGeachie, Barbara Venn-Brown, Luke R. Odell, Ngoc Chau, Annie Quan, Anna Mariana, Jennette A. Sakoff, Megan Chircop, Phillip J. Robinson, and Adam McCluskey. Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles—synthesis and functional activity of a family of indoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(12):3762–3773, 2009.
- [167] Eilon Woolf, Irina Grigorova, Adi Sagiv, Valentin Grabovsky, Sara W. Feigelson, Ziv Shulman, Tanja Hartmann, Michael Sixt, Jason G. Cyster, and Ronen Alon. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nature Immunology*, 8(10):1076–1085, 2007.
- [168] Thomas Quast, Felix Eppler, Verena Semmling, Cora Schild, Yahya Homsy, Shoshana Levy, Thorsten Lang, Christian Kurts, and Waldemar Kolanus. CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration. *Blood*, 118(7):1818–1827, 2011.
- [169] Jonathan D. Humphries, Adam Byron, and Martin J. Humphries. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19):3901–3903, 2006.
- [170] Li-Hsien Wang, Karen G. Rothberg, and Richard G.W. Anderson. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *The Journal of Cell Biology*, 123(5):1107–1117, 1993.
- [171] Richard Schlegel, Robert B. Dickson, Mark C. Willingham, and Ira H. Pastan. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(7):2291–2295, 1982.
- [172] Anne Peyroche, Bruno Antonny, Sylviane Robineau, Joel Acker, Jacqueline Cherfils, and Catherine L. Jackson. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Molecular Cell*, 3(3):275–285, 1999.
- [173] Yan Feng, Sidney Yu, Troy K. R. Lasell, Ashutosh P. Jadhav, Eric Macia, Pierre Chardin, Paul Melancon, Michael Roth, Timothy Mitchison, and Tomas Kirchhausen. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11):6469–6474, 2003.
- [174] Eunkyung Lee and Pietro de Camilli. Dynamin at actin tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1):161–166, 2002.
- [175] Daniel A. Fletcher and R. Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, 2010.

- [176] J. A. Cooper. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology*, 105(4):1473–1478, 1987.
- [177] Martine Coué, Stephen L. Brenner, Ilan Spector, and Edward D. Korn. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*, 213(2):316–318, 1987.
- [178] Gray Pearson, Fred Robinson, Tara B. Gibson, Bing-e Xu, Mahesh Karandikar, Kevin Berman, and Melanie H. Cobb. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2):153–183, 2001.
- [179] Brendan D. Manning and Lewis C. Cantley. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7):1261–1274, 2007.
- [180] Sachiko Tsukita and Shigenobu Yonemura. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49):34507–34510, 1999.
- [181] Martin J. Brown, Ruchika Nijhara, John A. Hallam, Michelle Gignac, Kenneth M. Yamada, Stanley L. Erlandsen, Jerome Delon, Michael Kruhlak, and Stephen Shaw. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood*, 102(12):3890–3899, 2003.
- [182] Tatsuo Kinashi and Koko Katagiri. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunology Letters*, 93(1):1–5, 2004.
- [183] Hwee San Lek, Vicky L. Morrison, Michael Conneely, Paul A. Campbell, David McGloin, Stefanie Kliche, Colin Watts, Alan Prescott, and Susanna C. Fagerholm. The spontaneously adhesive leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) integrin in effector T cells mediates rapid actin- and calmodulin-dependent adhesion strengthening to ligand under shear flow. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(21):14698–14708, 2013.
- [184] Jatta Huotari and Ari Helenius. Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17):3481–3500, 2011.
- [185] Sina V. Barysch, Shweta Aggarwal, Reinhard Jahn, and Silvio O. Rizzoli. Sorting in early endosomes reveals connections to docking- and fusion-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24):9697–9702, 2009.
- [186] Ryan J. Schulze, Shaun G. Weller, Barbara Schroeder, Eugene W. Krueger, Susan Chi, Carol A. Casey, and Mark A. McNiven. Lipid droplet breakdown requires

- p dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes.
- The Journal of Cell Biology*
- , 203(2):315–326, 2013.
- [187] E. Nielsen, F. Severin, J. M. Backer, A. A. Hyman, and M. Zerial. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biology*, 1(6):376–382, 1999.
 - [188] Anjana Nayal, Donna J. Webb, and Alan F. Horwitz. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1):94–98, 2004.
 - [189] Nicole M. Chapman and Jon C. D. Houtman. Functions of the FAK family kinases in T cells: beyond actin cytoskeletal rearrangement. *Immunologic Research*, 59(1-3):23–34, 2014.
 - [190] Shinya Tanaka, Takashi Morishita, Yuko Hashimoto, Seisuke Hattori, Shun Nakamura, Masabumi Shibuya, Koozi Matuoka, Tadaomi Takenawa, Takeshi Kurata, Kazuo Nagashima, and Michiyuki Matsuda. C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8):3443–3447, 1994.
 - [191] Nancy Hogg, Robert Henderson, Birgit Leitinger, Alison McDowall, Joanna Porter, and Paula Stanley. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunological Reviews*, 186(1):164–171, 2002.
 - [192] Marion Berard and David F. Tough. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*, 106(2):127–138, 2002.
 - [193] Nancy Hogg, Melanie Laschinger, Katherine Giles, and Alison McDowall. T-cell integrins: more than just sticking points. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 23):4695–4705, 2003.
 - [194] Peter Friedl and Eva-B. Brocker. TCR triggering on the move: Diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunological Reviews*, 186(1):83–89, 2002.
 - [195] Ronen Alon and Klaus Ley. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5):525–532, 2008.
 - [196] Bettina Kellersch and Waldemar Kolanus. Membrane-proximal signaling events in beta-2 integrin activation. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 43:245–257, 2006.
 - [197] Stephen G. Ward and Federica M. Marelli-Berg. Mechanisms of chemokine and

- antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *The Biochemical Journal*, 418(1):13–27, 2009.
- [198] Y. N. Danilov and R. L. Juliano. Phorbol ester modulation of integrin-mediated cell adhesion: a postreceptor event. *The Journal of Cell Biology*, 108(5):1925–1933, 1989.
- [199] D. F. Kucik, M. L. Dustin, J. M. Miller, and E. J. Brown. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(9):2139–2144, 1996.
- [200] Joachim Roland, Brendan J. Murphy, Barbara Ahr, Veronique Robert-Hebmann, Vincent Delauzun, Keith E. Nye, Christian Devaux, and Martine Biard-Piechaczyk. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood*, 101(2):399–406, 2003.
- [201] Nicole F. Neel, Evemie Schutyser, Jiqing Sai, Guo-Huang Fan, and Ann Richmond. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(6):637–658, 2005.
- [202] Jörg Renkawitz and Michael Sixt. Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Reports*, 11(10):744–750, 2010.
- [203] Bruno Antonny, Christopher Burd, Pietro de Camilli, Elizabeth Chen, Oliver Daumke, Katja Faelber, Marijn Ford, Vadim A. Frolov, Adam Frost, Jenny E. Hinshaw, Tom Kirchhausen, Michael M. Kozlov, Martin Lenz, Harry H. Low, Harvey McMahon, Christien Merrifield, Thomas D. Pollard, Phillip J. Robinson, Aurelien Roux, and Sandra Schmid. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*, 35(21):2270–2284, 2016.
- [204] Dipannita Dutta and Julie G. Donaldson. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular Logistics*, 2(4):203–208, 2012.
- [205] Andrei I. Ivanov. Pharmacological inhibitors of exocytosis and endocytosis: novel bullets for old targets. *Methods in Molecular Biology*, 1174:3–18, 2014.
- [206] Christien J. Merrifield, Morris E. Feldman, Lei Wan, and Wolfhard Almers. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nature Cell Biology*, 4(9):691–698, 2002.
- [207] Sarah E. Palmer, Iwona I. Smaczynska-de Rooij, Christopher J. Marklew, Ellen G. Allwood, Ritu Mishra, Simeon Johnson, Martin W. Goldberg, and Kathryn R. Ayscough. A dynamin-actin interaction is required for vesicle scission during endocytosis in yeast. *Current Biology*, 25(7):868–878, 2015.

- [208] Tim Lämmermann and Ronald N. Germain. The multiple faces of leukocyte interstitial migration. *Seminars in Immunopathology*, 36(2):227–251, 2014.
- [209] J. Thomas Parsons, Alan Rick Horwitz, and Martin A. Schwartz. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9):633–643, 2010.
- [210] Stephen C. Bunnell, Veena Kapoor, Ronald P. Tribble, Weiguo Zhang, and Lawrence E. Samelson. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading. *Immunity*, 14(3):315–329, 2001.
- [211] Matthias Plessner, Michael Melak, Pilar Chinchilla, Christian Baarlink, and Robert Grosse. Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(18):11209–11216, 2015.
- [212] C. Lamaze, L. M. Fujimoto, H. L. Yin, and S. L. Schmid. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33):20332–20335, 1997.
- [213] Robert Roskoski, JR. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2):105–143, 2012.
- [214] O. Kranenburg, I. Verlaan, and W. H. Moolenaar. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50):35301–35304, 1999.
- [215] O. Benard, Z. Naor, and R. Seger. Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7):4554–4563, 2001.
- [216] Wolfgang Weninger, Mate Biro, and Rohit Jain. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nature Reviews. Immunology*, 14(4):232–246, 2014.
- [217] Stefano Fais and Walter Malorni. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(5):556–563, 2003.
- [218] Daniel D. Billadeau, Jeffrey C. Nolz, and Timothy S. Gomez. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nature Reviews. Immunology*, 7(2):131–143, 2007.
- [219] J. M. Serrador, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *The Journal of Cell Biology*, 138(6):1409–1423, 1997.

- [220] Jong-Hwan Lee, Tomoya Katakai, Takahiro Hara, Hiroyuki Gonda, Manabu Sugai, and Akira Shimizu. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *The Journal of Cell Biology*, 167(2):327–337, 2004.
- [221] Yansong Li, Tatsuhiko Harada, Yuang-Taung Juang, Vasileios C. Kytтарыs, Ying Wang, Michael Zidanic, Kenneth Tung, and George C. Tsokos. Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 178(3):1938–1947, 2007.
- [222] Stephanie E. Lepage, Masazumi Tada, and Ashley E. E. Bruce. Zebrafish Dynamin is required for maintenance of enveloping layer integrity and the progression of epiboly. *Developmental Biology*, 385(1):52–66, 2014.
- [223] Gaël Ménasché, Stefanie Kliche, Natalie Bezman, and Burkhardt Schraven. Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. *Immunological Reviews*, 218:82–91, 2007.
- [224] Mika Shimonaka, Koko Katagiri, Toshinori Nakayama, Naoya Fujita, Takashi Tsuruo, Osamu Yoshie, and Tatsuo Kinashi. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *The Journal of Cell Biology*, 161(2):417–427, 2003.
- [225] Li Liu, Barbara R. Schwartz, Joan Tupper, Nancy Lin, Robert K. Winn, and John M. Harlan. The GTPase Rap1 regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-stimulated but not ligand-induced beta 1 integrin-dependent leukocyte adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43):40893–40900, 2002.
- [226] Gregory Prelich. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3):841–854, 2012.
- [227] Trever G. Bivona, Heidi H. Wiener, Ian M. Ahearn, Joseph Silletti, Vi K. Chiu, and Mark R. Philips. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 164(3):461–470, 2004.
- [228] Stefanie Kliche, Dennis Breitling, Mauro Togni, Rico Pusch, Katja Heuer, Xiaoqian Wang, Christian Freund, Ana Kasirer-Friede, Gael Menasche, Gary A. Koretzky, and Burkhardt Schraven. The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19):7130–7144, 2006.
- [229] C. Wu, C. F. Lai, and W. C. Mobley. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *The Journal of Neuroscience*, 21(15):5406–5416, 2001.

- [230] Shu Hisata, Toshiaki Sakisaka, Takeshi Baba, Tomohiro Yamada, Kazuhiro Aoki, Michiyuki Matsuda, and Yoshimi Takai. Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 178(5):843–860, 2007.
- [231] V. Pizon, M. Desjardins, C. Bucci, R. G. Parton, and M. Zerial. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *Journal of Cell Science*, 107 (Pt 6):1661–1670, 1994.
- [232] Anna Ulbricht, Felix J. Eppler, Victor E. Tapia, Peter F. M. van der Ven, Nico Hampe, Nils Hersch, Padmanabhan Vakeel, Daniela Stadel, Albert Haas, Paul Saftig, Christian Behrends, Dieter O. Fürst, Rudolf Volkmer, Bernd Hoffmann, Waldemar Kolanus, and Jörg Höhfeld. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Current Biology*, 23(5):430–435, 2013.
- [233] C. R. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697):82–86, 1998.
- [234] Seiji Tadokoro, Sanford J. Shattil, Koji Eto, Vera Tai, Robert C. Liddington, Jose M. de Pereda, Mark H. Ginsberg, and David A. Calderwood. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 302(5642):103–106, 2003.
- [235] Michael D. Schaller. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 7):1007–1013, 2010.
- [236] Alex Braiman and Noah Isakov. The Role of Crk Adaptor Proteins in T-Cell Adhesion and Migration. *Frontiers in Immunology*, 6:509, 2015.
- [237] Adam Mor, Joseph P. Wynne, Ian M. Ahearn, Michael L. Dustin, Guangwei Du, and Mark R. Philips. Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 29(12):3297–3306, 2009.
- [238] Jeffrey C. Nolz, Lucas P. Nacusi, Colin M. Segovis, Ricardo B. Medeiros, Jason S. Mitchell, Yoji Shimizu, and Daniel D. Billadeau. The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *The Journal of Cell Biology*, 182(6):1231–1244, 2008.
- [239] Kristof van Kolen, Kambiz Gilany, Luc Moens, Eddy L. Esmans, and Herman Slegers. P2Y12 receptor signalling towards PKB proceeds through IGF-I recep-

- tor cross-talk and requires activation of Src, Pyk2 and Rap1. *Cellular Signalling*, 18(8):1169–1181, 2006.
- [240] A. M. Glodek, Y. Le, D. M. Dykxhoorn, S-Y Park, G. Mostoslavsky, R. Mulligan, J. Lieberman, H. E. Beggs, M. Honczarenko, and L. E. Silberstein. Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia*, 21(8):1723–1732, 2007.
- [241] Victoriya A. Rufanova, Anna Alexanian, Tetsuro Wakatsuki, Adam Lerner, and Andrey Sorokin. Pyk2 mediates endothelin-1 signaling via p130Cas/BCAR3 cascade and regulates human glomerular mesangial cell adhesion and spreading. *Journal of Cellular Physiology*, 219(1):45–56, 2009.
- [242] Caylib A. Durand, Jens Westendorf, Kathy W. K. Tse, and Michael R. Gold. The Rap GTPases mediate CXCL13- and sphingosine1-phosphate-induced chemotaxis, adhesion, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 36(8):2235–2249, 2006.
- [243] Guillaume Carmona, Stephan Göttig, Alessia Orlandi, Jürgen Scheele, Tobias Bäuerle, Manfred Jugold, Fabian Kiessling, Reinhard Henschler, Andreas M. Zeiher, Stefanie Dimmeler, and Emmanouil Chavakis. Role of the small GTPase Rap1 for integrin activity regulation in endothelial cells and angiogenesis. *Blood*, 113(2):488–497, 2009.
- [244] Yoshihisa Kaizuka, Adam D. Douglass, Rajat Varma, Michael L. Dustin, and Ronald D. Vale. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51):20296–20301, 2007.
- [245] Alexander Babich, Shuixing Li, Roddy S. O’Connor, Michael C. Milone, Bruce D. Freedman, and Janis K. Burkhardt. F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLCgamma1 signaling during T cell activation. *The Journal of Cell Biology*, 197(6):775–787, 2012.
- [246] Sricharan Murugesan, Jinsung Hong, Jason Yi, Dong Li, Jordan R. Beach, Lin Shao, John Meinhardt, Grey Madison, Xufeng Wu, Eric Betzig, and John A. Hammer. Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *The Journal of Cell Biology*, 215(3):383–399, 2016.
- [247] Michael L. Dustin and David Depoil. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nature Reviews. Immunology*, 11(10):672–684, 2011.
- [248] Wei-Ting Chao and Jeannette Kunz. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Letters*, 583(8):1337–1343, 2009.

- [249] Markus Moser, Kyle R. Legate, Roy Zent, and Reinhard Fässler. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, 324(5929):895–899, 2009.
- [250] Craig T. Lefort, Jan Rossaint, Markus Moser, Brian G. Petrich, Alexander Zarbock, Susan J. Monkley, David R. Critchley, Mark H. Ginsberg, Reinhard Fässler, and Klaus Ley. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*, 119(18):4275–4282, 2012.
- [251] Kris A. Reedquist, Ewan Ross, Elianne A. Koop, Rob M.F. Wolthuis, Fried J.T. Zwartkruis, Yvette van Kooyk, Mike Salmon, Christopher D. Buckley, and Johannes L. Bos. The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 148(6):1151–1158, 2000.
- [252] Yumi Tohyama, Koko Katagiri, Ruggero Pardi, Chafen Lu, Timothy A. Springer, and Tatsuo Kinashi. The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6):2570–2582, 2003.
- [253] Kyoung-Jin Chung, Ioannis Mitroulis, Johannes R. Wiessner, Ying Yi Zheng, Gabriele Siegert, Markus Sperandio, and Triantafyllos Chavakis. A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase. *Molecular Biology of the Cell*, 25(19):2948–2955, 2014.
- [254] Stefanie Kliche, Tim Worbs, Xiaoqian Wang, Janine Degen, Irene Patzak, Bernhard Meineke, Mauro Togni, Markus Moser, Annegret Reinhold, Friedemann Kiefer, Christian Freund, Reinhold Förster, and Burkhard Schraven. CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood*, 119(3):777–785, 2012.
- [255] Koko Katagiri, Mika Shimonaka, and Tatsuo Kinashi. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12):11875–11881, 2004.
- [256] Johannes L. Bos. Linking Rap to cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(2):123–128, 2005.
- [257] Simon Stritt, Karen Wolf, Viola Lorenz, Timo Vogtle, Shuchi Gupta, Michael R. Bösl, and Bernhard Nieswandt. Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) is dispensable for platelet integrin activation and function in mice. *Blood*, 125(2):219–222, 2015.
- [258] Wenjuan Su, Joseph Wynne, Elaine M. Pinheiro, Marianne Strazza, Adam Mor, Emilie Montenont, Jeffrey Berger, David S. Paul, Wolfgang Bergmeier, Frank B.

- Gertler, and Mark R. Philips. Rap1 and its effector RIAM are required for lymphocyte trafficking. *Blood*, 126(25):2695–2703, 2015.
- [259] Sarah Klapproth, Markus Sperandio, Elaine M. Pinheiro, Monika Prünster, Oliver Soehnlein, Frank B. Gertler, Reinhard Fässler, and Markus Moser. Loss of the Rap1 effector RIAM results in leukocyte adhesion deficiency due to impaired beta2 integrin function in mice. *Blood*, 126(25):2704–2712, 2015.
- [260] Adam Byron, Jonathan D. Humphries, Janet A. Askari, Sue E. Craig, A. Paul Mould, and Martin J. Humphries. Anti-integrin monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 22):4009–4011, 2009.
- [261] Kim M. T. de Bruyn, Savithri Rangarajan, Kris A. Reedquist, Carl G. Figdor, and Johannes L. Bos. The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33):29468–29476, 2002.
- [262] Kyle R. Legate, Sara A. Wickström, and Reinhard Fässler. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes and Development*, 23(4):397–418, 2009.
- [263] Francisco Sánchez-Madrid and Juan M. Serrador. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(5):353–359, 2009.
- [264] Y. van Kooyk and C. G. Figdor. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(5):542–547, 2000.
- [265] Sabina E. Winograd-Katz, Reinhard Fässler, Benjamin Geiger, and Kyle R. Legate. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(4):273–288, 2014.
- [266] Jianghui Meng. Distinct functions of dynamin isoforms in tumorigenesis and their potential as therapeutic targets in cancer. *Oncotarget*, 2017.
- [267] Yi-Lei Zhang, Ruo-Chen Wang, Ken Cheng, Brian Z. Ring, and Li Su. Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer Biology and Medicine*, 14(1):90–99, 2017.
- [268] Bin Xu, Liang Hong Teng, Sabrina Daniela da Silva, Krikor Bijian, Samir Al Bashir, Su Jie, Michael Dolph, Moulay A. Alaoui-Jamali, and Tarek A. Bismar. The significance of dynamin 2 expression for prostate cancer progression, prognostication, and therapeutic targeting. *Cancer Medicine*, 3(1):14–24, 2014.
- [269] Yoo-Young Lee, Hye-Kyung Jeon, Jungeun Lee, Ji Eun Hong, In-Gu Do, Chel Hun Choi, Tae-Joong Kim, Byoung-Gie Kim, Duk-Soo Bae, Yong-Chul Kim, and Jeong-

Won Lee. Dynamin 2 inhibitors as novel therapeutic agents against cervical cancer cells. *Anticancer Research*, 36(12):6381–6388, 2016.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes zu nennen ist hierbei Herr Prof. Dr. Waldemar Kolanus, der mich als Doktorand in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Ihm danke ich für seine große Hilfsbereitschaft und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung während meiner Zeit am LIMES Institut.

Frau PD Dr. Heike Weighardt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Höhfeld und Herrn Prof. Dr. Anton Bovier, die sich netterweise als fachnahes beziehungsweise fachfremdes Mitglied meiner Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben.

Dr. Thomas Quast und Dr. Tatjana Hoppe danke ich recht herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Christa Mandel, Helga Ueing, Simon Schneider, Yamel Cardona und Lee Xian See möchte ich zudem für die tatkräftige technische Unterstützung im Labor danken.

Prof. Dr. Takafumi Inoue danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor an der Waseda Universität in Tokio und eine sehr schöne Zeit dort.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Immunologie und Zellbiologie möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit, die super Atmosphäre, die erhaltene Unterstützung und viele anregende Diskussionen bedanken. Ich hatte wirklich eine super Zeit mit Euch und kann nur hoffen, dass ich in Zukunft wieder so tolle Menschen als Arbeitskollegen haben werde. Bitte seid mir nicht böse, dass ich Euch nicht alle einzeln erwähne, aber im Laufe der Jahre ist diese Liste doch recht lang geworden.

Des Weiteren möchte ich dem Land NRW für mein Stipendium (*NRW International Graduate Research School LIMES Chemical Biology*) und der DFG (SFBs 645 und 704) für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

Schließlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern, den Müpplers und Tatjana dafür bedanken, dass ich immer auf sie zählen kann und dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe. Euch ist diese Arbeit gewidmet.